

2003-1763A  
H-Yaku

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日                      2003年 8月 7日  
Date of Application:

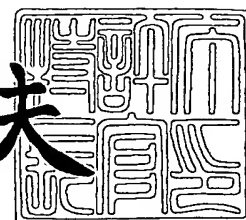
出願番号                      特願2003-288707  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [JP2003-288707]

出願人                      松下電器産業株式会社  
Applicant(s):

2003年10月15日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号    出証特2003-3084750

【書類名】 特許願  
【整理番号】 2033850188  
【提出日】 平成15年 8月 7日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12Q001/68  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内  
    【氏名】 行政 哲男  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内  
    【氏名】 夜久 英信  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内  
    【氏名】 岡 弘章  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000005821  
    【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100097445  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 岩橋 文雄  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100103355  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 坂口 智康  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100109667  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 内藤 浩樹  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 011305  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 9809938

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

塩基種が置換されている可能性のある置換領域を有する二本鎖の標的核酸と、塩基種判別用プライマーと、核酸ポリメラーゼと、dNTPsとを含む溶液を調製する工程（a）と

、上記溶液中において、上記塩基種判別用プライマーを伸長するプライマー伸長反応を進行させる工程（b）と、

上記プライマー伸長反応の進行の程度を解析することによって、上記置換領域の塩基種を判別する工程（c）とを含み、

上記塩基種判別用プライマーは、上記二本鎖の標的核酸のうち的一方に部分的にハイブリダイズ可能な一本鎖の核酸からなり、

上記一本鎖の核酸は、その3'末端塩基を含み、上記置換領域の塩基種に応じて、上記二本鎖の標的核酸のうち的一方に対して相補的または非相補的のいずれかとなり得る塩基または塩基配列を有する置換対応領域と、上記置換対応領域の5'側に隣接し、上記二本鎖の標的核酸のうち的一方に対して非相補的な塩基配列を有する非相補領域と、上記非相補領域の5'側に隣接し、上記二本鎖の標的核酸のうち的一方に対して相補的な塩基配列を有する相補領域とを備えていることを特徴とする塩基種判別方法。

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の塩基種判別方法において、

上記核酸ポリメラーゼは、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が実質的に無いことを特徴とする塩基種判別方法。

**【請求項 3】**

請求項 1 に記載の塩基種判別方法において、

上記一本鎖の核酸は、DNAであることを特徴とする塩基種判別方法。

**【請求項 4】**

請求項 1 に記載の塩基種判別方法において、

上記工程（a）では、上記溶液中に、上記二本鎖の核酸のうちの他方にハイブリダイズ可能な一本鎖の核酸からなるリバースプライマーをさらに含み、

上記工程（b）では、上記プライマー伸長反応を、PCR、SDA、RCR、LAMP および TMA からなる群から選択されるいずれか 1 つの塩基配列増幅法を用いて進行させることを特徴とする塩基種判別方法。

**【請求項 5】**

請求項 1 に記載の塩基種判別方法において、

上記工程（c）では、上記塩基配列増幅法によって増幅された塩基配列の増幅量を、電気泳動法、質量分析法および液体クロマトグラフィーからなる群から選択されるいずれか 1 つの方法で測定することによって、上記プライマー伸長反応の進行の程度を解析することを特徴とする塩基種判別方法。

**【請求項 6】**

請求項 1 に記載の塩基種判別方法において、

上記工程（c）では、プライマー伸長反応によって生成するピロリン酸の量を測定することによって、上記プライマー伸長反応の進行の程度を解析することを特徴とする塩基種判別方法。

**【請求項 7】**

請求項 6 に記載の塩基種判別方法において、

前記ピロリン酸の量を測定する方法は、

試料中のピロリン酸を無機リン酸に変換する工程、

前記試料を、グリセルアルデヒド 3-リン酸、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ、および電子メディエータを含む測定系に供する工程、

および、前記測定系において電流値を測定する工程を有し、

前記電流値が、前記試料中のピロリン酸の濃度を示すことを特徴とする塩基種判別方法。

【請求項 8】

前記電子メディエータが、フェリシアン化物、1, 2-ナフトキノン-4-スルホン酸、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール、ジメチルベンゾキノン、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムサルフェート、メチレンブルー、ガロシアニン、チオニン、フェナジンメトサルフェート、およびメルドラブルーからなる群より選択される少なくとも一種である、請求項 7 に記載の塩基種判別方法。

【請求項 9】

前記測定系がジアホラーゼをさらに含む、請求項 7 に記載の塩基種判別方法。

【請求項 10】

請求項 7 に記載の塩基種判別方法において、

前記ピロリン酸の無機リン酸への変換が、ピロフォスファターゼを用いて行われる、請求項 7 に記載の塩基種判別方法。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の塩基種判別方法において、

上記工程 (a) では、上記溶液中に、もう一つの塩基種判別用プライマーをさらに含み、

上記もう一つの塩基種判別用プライマーは、上記二本鎖の標的核酸のうちの一方に部分的にハイブリダイズ可能なもう一つの一本鎖の核酸からなり、

上記もう一つの一本鎖の核酸は、その 3' 末端塩基を含み、上記置換領域の塩基種に応じて、上記二本鎖の標的核酸のうちの一方に対して相補的または非相補的のいずれかとなり得、且つ上記置換対応領域と異なる塩基または塩基配列を有するもう一つの置換対応領域と、上記もう一つの置換対応領域の 5' 側に隣接し、上記二本鎖の標的核酸のうちの一方に対して非相補的な塩基配列を有するもう一つの非相補領域と、上記もう一つの非相補領域の 5' 側に隣接し、上記二本鎖の標的核酸のうちの一方に対して相補的な塩基配列を有するもう一つの相補領域とを備えていることを特徴とする塩基種判別方法。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の塩基種判別方法において、

上記一本鎖の核酸と、上記もう一つの一本鎖の核酸とは、長さが互いに異なることを特徴とする塩基種判別方法。

【請求項 13】

請求項 11 に記載の塩基種判別方法において、

上記一本鎖の核酸と、上記もう一つの一本鎖の核酸とは、互いに蛍光波長が異なる標識がなされていることを特徴とする塩基種判別方法。

【請求項 14】

塩基種が置換されている可能性のある置換領域を含む一本鎖の標的核酸に部分的にハイブリダイズ可能な一本鎖の核酸からなる塩基種判別用プライマーであって、

上記一本鎖の核酸は、その 3' 末端塩基を含み、上記置換領域の塩基種に応じて、上記一本鎖の標的核酸に対して相補的または非相補的のいずれかとなり得る塩基または塩基配列を有する置換対応領域と、

上記置換対応領域の 5' 側に隣接し、上記一本鎖の標的核酸に対して非相補的な塩基配列を有する非相補領域と、

上記非相補領域の 5' 側に隣接し、上記一本鎖の標的核酸に対して相補的な塩基配列を有する相補領域とを備えていることを特徴とする塩基種判別用プライマー。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の塩基種判別用プライマーにおいて、

上記置換対応領域に含まれる塩基数と上記非相補領域に含まれる塩基数との合計は、3 塩基以上であることを特徴とする塩基種判別用プライマー。

**【請求項 1 6】**

請求項 1 4 に記載の塩基種判別用プライマーにおいて、

上記置換対応領域は、上記一本鎖の核酸の 3' 末端塩基のみであることを特徴とする塩基種判別用プライマー。

【書類名】明細書

【発明の名称】塩基種判別方法及び塩基種判別用プライマー

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸の塩基配列中の所望の塩基種を判別する方法およびそれに用いるプライマーに関する。

【背景技術】

【0002】

2001年2月に、国際ヒトゲノムプロジェクトと米国のセレーラ社とから、ヒトゲノムのドラフトシーケンスが公開された。このことは、特に医療分野において非常に重要な出来事であった。しかし、ヒトゲノムのドラフトシーケンスが直ちに我々の生活や医療において活かされるわけではない。公開されたドラフトシーケンスは、あくまでもおおまかにヒトゲノムの塩基配列を決定した結果に過ぎず、個々の遺伝子の機能、およびそれらに基づく様々な病気のメカニズムの解明は今後の大きな課題である。そこで現在、最も注目されているのが、DNAのSNP (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基多型) である。

【0003】

SNPは、同種個体間で最も多く観察される遺伝子多型であり、具体的にはゲノムDNAの塩基配列中のある特定部位に観察される一塩基対の相違 (置換) である。SNPは、数百〜一千塩基対に1箇所の割合で存在していると推測されている。

【0004】

SNPは、病気のかかりやすさ、特定の薬剤に対する応答性、および副作用などに関連する遺伝子を探索する際の非常に有用な多型マーカーである。また、SNPの中には、遺伝子発現調節に影響を及ぼすものがある。例えば、DNAの塩基配列中のSNPを含む部分に対応するタンパク質中のアミノ酸の変化は、そのタンパク質の働きに影響を与え、その結果、他の遺伝子産物の質的異常や量的異常につながることもある。このような場合、SNPそのものを、病気のかかりやすさ、特定の薬剤に対する応答性、および副作用などの個人差の判定に利用することができる。

【0005】

従って、SNPの探索や研究を行なうことは非常に重要である。現在わが国においても、五大疾患に関連するSNPの探索・研究が特に盛んに行なわれている。これらのSNPの探索・研究の結果は、3〜5年後に実際の医療に利用され始め、臨床の場等で我々自身のSNPが診断されるようになると考えられる。そこで、各個人におけるSNPパターンを解析する、いわゆるSNP部位の塩基種の判定技術 (以下、SNPタイピング技術と称する) が非常に重要視されている。

【0006】

またSNPとは異なるが、ゲノムDNAの塩基配列中のたった一塩基対の突然変異が重篤な疾病につながる例が知られている。従って、このような1塩基対の置換の有無を判定することもまた非常に重要になってきている。SNPタイピング技術は、このような1塩基対の置換の有無の判定においても有効な技術である。

【0007】

現在、様々なSNPタイピング技術が開発あるいは既に実施されている。それらの技術のうち、最も簡便な技術の1つでは、プライマー伸長反応を利用する。この技術では、標的DNAのSNP部位に隣接する塩基配列に対して相補的な塩基配列を有し、標的DNAのSNP部位の塩基種に応じて伸長反応の進行に差を生じさせるプライマー (以下、タイピングプライマーと称する) を用い、プライマー伸長反応の進行の差を判定することによって、SNPタイピングを行なう。

【0008】

多くの場合、上述のようなタイピングプライマーのプライマー伸長反応の進行の差の解析には、PCR、NASBA、LCR、SDA、RCR、LAMPおよびTMA反応等の

標的の塩基配列を増幅する反応を利用する。上記の反応の後、電気泳動等の方法によって標的の塩基配列の増幅の程度を解析することによって、SNP部位のタイピングを行なう。具体的には、以下に、標的の塩基配列を増幅する反応としてPCR反応を用い、その後電気泳動によってプライマー伸長反応の進行の差を解析する場合を、図1、図2および図3を参照しながら説明する。

#### 【0009】

まず、図1(a)に示す工程で、SNP部位S1を有する標的のDNA1を含む試料溶液を調製する。続いて、DNA1を含む試料溶液に、タイピングプライマー7a、リバープライマー7b、DNAポリメラーゼ8および4種類のdNTPsを添加する。同様に、図2(a)に示す工程で、SNP部位S2を有する標的のDNA2を含む試料溶液を調製する。続いて、DNA2を含む試料溶液に、タイピングプライマー7a、リバープライマー7b、DNAポリメラーゼ8および4種類のdNTPsを添加する。なお、実際のゲノムDNA等では無数のSNP部位が存在するが、ここではDNA1およびDNA2のうちのタイピングプライマー7aおよびリバープライマー7bが結合する領域において、DNA1のSNP部位S1を除く部分と、DNA2のSNP部位S2を除く部分とは、全く同じ塩基配列であるものとする。

#### 【0010】

次に、図1(b)に示す工程で、DNA1を熱変性などによって一本鎖DNA3および4とする。同様に、図2(b)に示す工程で、DNA2を熱変性などによって一本鎖DNA5および6とする。

#### 【0011】

次に、図1(c)に示す工程で、タイピングプライマー7aおよびリバープライマー7bが、一本鎖DNA4および一本鎖DNA3にそれぞれハイブリダイズするように温度調節を行なう。このとき、タイピングプライマー7aは、一本鎖DNA4のSNP部位S1(ここでは、アデニン(以下Aと記す))から3'末端側の領域に完全にハイブリダイズする。一方、図2(c)に示す工程でも同様に、タイピングプライマー7aおよびリバープライマー7bが、一本鎖DNA6および一本鎖DNA5にそれぞれハイブリダイズするように温度調節を行なう。このとき、タイピングプライマー7aは、その3'末端の塩基T以外が、一本鎖DNA6のSNP部位S2(ここでは、グアニン(以下Gと記す))よりも3'末端側の領域にハイブリダイズする。

#### 【0012】

次に、図1(d)に示す工程で、プライマー伸長反応が進行するように温度調節を行なう。SNP部位S1がアデニン(以下Aと記す)である一本鎖DNA4にタイピングプライマー7aは完全にハイブリダイズしているので、プライマー伸長反応が進行し、DNAポリメラーゼ8によってdNTPsが消費される。

#### 【0013】

一方、図2(d)に示す工程でも同様に、プライマー伸長反応が進行するように温度調節を行なう。しかしながら、SNP部位S2がGである一本鎖DNA6にタイピングプライマー7の3'末端の塩基Tのみハイブリダイズできない状態になっている。このため、プライマー伸長反応が正常に進行しにくい。

#### 【0014】

図3は、上記図1および図2に示した工程の後、それぞれの反応溶液に含まれるDNA断片を電気泳動によって解析した図である。図1の場合では、タイピングプライマー7aからのプライマー伸長反応が良好に進行するため、所望の塩基配列を示すバンドが、図3のレーン1に示すように矢印Aで示される位置に検出される。一方、図2の場合では、タイピングプライマー7aからのプライマー伸長反応の進行が非常に悪いため、所望の塩基配列を示すバンドは、図3のレーン2に示すように矢印Aで示される位置にほとんど確認されない。この結果から、SNP部位S1の塩基種をタイピングすることができる。

#### 【0015】

上述のように、タイピングプライマーを用いたSNPタイピング技術は、特に困難な操

作や特殊な装置を必要としないので、現在知られているSNPタイピング技術の中でも最も有効な技術の一つと考えられている。しかしながら、タイピングプライマーを用いたSNPタイピング技術では、タイピングプライマーの設計が最も重要である。タイピングプライマーには、SNP部位の塩基種に応じてプライマー伸長反応の進行の差が、明確かつ再現性よく現れるように設計されている必要がある。従って、プライマー伸長反応の進行の差が、より明確かつ再現性よく現れるタイピングプライマーの開発が盛んに行われている。

#### 【0016】

最も代表的なタイピングプライマーは、上記図1および図2に示したタイピングプライマー7aのように、一本鎖の標的核酸のSNP部位の3'側に隣接する塩基配列と、完全にハイブリダイズし、且つ、タイピングプライマーの3'末端塩基の種類と、一本鎖の標的核酸のSNP部位の塩基の種類との関係によって、プライマー伸長反応の進行に差が生じるように設計されている。

#### 【0017】

しかし、上記図1および図2に示した方法で用いるタイピングプライマーは正確なSNPタイピングにおいては十分ではない。図2(c)に示すように、タイピングプライマーの3'末端の塩基が、SNP部位S2にハイブリダイズできない状態となっても、反応温度や時間の条件を厳密に制御しなければ、プライマー伸長反応が、タイピングプライマーが完全にハイブリダイズする場合と同様の効率で進行することがある。このような場合、正確なSNPタイピングは不可能となる。

#### 【0018】

そこで、最近開発されたタイピングプライマーとして、東洋紡績(株)によって開発されたASP(A l l e l e S p e c i f i c P r i m e r)がある(非特許文献1を参照)。ASPの3'末端塩基は、標的核酸の標的のSNP部位の5'側に隣接する塩基と相補的であり、ASPの3'末端から2番目の塩基が標的核酸の標的のSNP部位に対応しており、さらにその3'末端から3番目の塩基が標的核酸の塩基に対して非相補的であるように設計されているプライマーである。ASPを、校正活性の強い $\alpha$ 型DNAポリメラーゼとともに用いて、プライマー伸長反応を行なうことによって、上述の図1および図2に示した方法よりもSNP部位の塩基種の判別を正確に行なうことができると報告されている。

#### 【0019】

具体的には、図1および図2に示す方法において、タイピングプライマー7aの代わりにASPを用い、DNAポリメラーゼ8として校正活性の強い $\alpha$ 型DNAポリメラーゼを用いてプライマー伸長反応を行なう。このとき、図4(a)に示すように、ASP100の3'末端から2番目の塩基(T)と一本鎖DNA4のSNP部位S1の塩基(A)とが相補的である場合、良好にプライマー伸長反応が進行する。一方、図4(b)に示すように、ASP100の3'末端から2番目の塩基(T)と一本鎖DNA6のSNP部位S2の塩基(G)とが相補的でない場合には、プライマー伸長反応がほとんど進行しない。また、プライマー伸長反応の進行の差が、上記図1および図2に示した方法に比べて大きくなると報告されている。

【非特許文献1】東洋紡績(株)、平成14年10月15日検索、インターネット<URL(<http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/product/custom/snps/snps.html>)>

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0020】

本発明は、核酸中の所望の塩基の種類をさらに正確に且つ再現性よく判別するための塩基種判別方法およびそれに用いるプライマーを提供する。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0021】



本発明の塩基種判別方法は、塩基種が置換されている可能性のある置換領域を有する二本鎖の標的核酸と、塩基種判別用プライマーと、核酸ポリメラーゼと、dNTPsとを含む溶液を調製する工程(a)と、上記溶液中において、上記塩基種判別用プライマーを伸長するプライマー伸長反応を進行させる工程(b)と、上記プライマー伸長反応の進行の程度を解析することによって、上記置換領域の塩基種を判別する工程(c)とを含み、上記塩基種判別用プライマーは、上記二本鎖の標的核酸のうち的一方に部分的にハイブリダイズ可能な一本鎖の核酸からなり、上記一本鎖の核酸は、その3'末端塩基を含み、上記置換領域の塩基種に応じて、上記二本鎖の標的核酸のうち的一方に対して相補的または非相補的のいずれかとなり得る塩基または塩基配列を有する置換対応領域と、上記置換対応領域の5'側に隣接し、上記二本鎖の標的核酸のうち的一方に対して非相補的な塩基配列を有する非相補領域と、上記非相補領域の5'側に隣接し、上記二本鎖の標的核酸のうち的一方に対して相補的な塩基配列を有する相補領域とを備えている。

#### 【0022】

本発明の塩基種判別方法では、塩基種判別用プライマーを、塩基種が置換されている可能性のある置換領域を含む一本鎖の標的核酸に作用させた場合、相補領域は、一本鎖の標的核酸にハイブリダイズする。また、非相補領域は、一本鎖の標的核酸にハイブリダイズすることができない。置換対応領域の塩基または塩基配列が、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基または塩基配列に相補的である場合、置換対応領域は一本鎖の標的核酸の置換領域にハイブリダイズする。一方、置換対応領域の塩基または塩基配列が、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基または塩基配列に非相補的である場合、核酸の置換領域にハイブリダイズできない。

#### 【0023】

一本鎖の標的核酸に対して、塩基種判別用プライマーの非相補領域が離間した状態となるものの、置換対応領域が一本鎖の標的核酸にハイブリダイズしている場合、3'末端から核酸を伸長させる酵素である核酸ポリメラーゼが、塩基種判別用プライマーの3'末端に正常に作用できる状態となる。

#### 【0024】

これに対して、一本鎖の標的核酸に対して、塩基種判別用プライマーの非相補領域および置換対応領域がいずれもハイブリダイズできず、一本鎖の標的核酸に対して非相補領域および置換対応領域が離間した状態となった場合、核酸ポリメラーゼが、塩基種判別用プライマーの3'末端に正常に作用できない。

#### 【0025】

このため、置換対応領域の塩基または塩基配列が、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基または塩基配列と相補的であり、一本鎖の核酸の置換領域にハイブリダイズする場合、プライマー伸長反応は良好に生じる。しかし、置換対応領域の塩基または塩基配列が、一本鎖の核酸の置換領域の塩基または塩基配列と非相補的であり、核酸の置換領域にハイブリダイズできない場合、プライマー伸長反応は良好に生じない。

#### 【0026】

従って、一本鎖の標的核酸の置換領域と塩基種判別用プライマーの置換対応領域とが相補的である場合と、一本鎖の標的核酸の置換領域と塩基種判別用プライマーの置換対応領域とが非相補的である場合との間での、プライマー伸長反応の進行の差が大きくなる。

#### 【0027】

そこで、プライマー伸長反応の進行の差を解析することによって、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基または塩基配列の塩基種を判別することができる。

#### 【0028】

上記核酸ポリメラーゼは、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が実質的に無いことが好ましい。

#### 【0029】

3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が実質的に無いDNAポリメラーゼを用いると、塩基種判別用プライマーの置換対応領域が、一本鎖の核酸の置換領域の塩基または塩基配列と

非相補的な塩基または塩基配列を有しており、核酸の置換領域にハイブリダイズできない場合にも、置換対応領域および非相補領域のヌクレオチドを切断した後に、プライマー伸長反応を進行させてしまう、ということがなくなる。従って、一本鎖の標的核酸の置換領域の正確な塩基種の判別が不可能となるおそれが解消される。

【0030】

上記一本鎖の核酸は、DNAであることが好ましい。

【0031】

DNAは、化学的に非常に安定であり、取り扱いも簡単で、入手も容易だからである。

【0032】

上記工程(a)では、上記溶液中に、上記二本鎖の核酸のうちの他方にハイブリダイズ可能な一本鎖の核酸からなるリバースプライマーをさらに含み、上記工程(b)では、上記プライマー伸長反応を、PCR、NASBA、LCR、SDA、RCR、LAMPおよびTMAからなる群から選択されるいずれか1つの塩基配列増幅法を用いて進行させてもよい。

【0033】

上記工程(c)では、上記塩基配列増幅法によって増幅された塩基配列の増幅量を、電気泳動法、質量分析法および液体クロマトグラフィーからなる群から選択されるいずれか1つの方法で測定することによって、上記プライマー伸長反応の進行の程度を解析する構成としてもよい。

【0034】

上記工程(c)では、プライマー伸長反応によって生成するピロリン酸の量を測定することによって、上記プライマー伸長反応の進行の程度を解析する構成としてもよい。

【0035】

上記工程(a)では、上記溶液中に、もう一つの塩基種判別用プライマーをさらに含み、上記もう一つの塩基種判別用プライマーは、上記二本鎖の標的核酸のうちの一方に部分的にハイブリダイズ可能なもう一つの一本鎖の核酸からなり、上記もう一つの一本鎖の核酸は、その3'末端塩基を含み、上記置換領域の塩基種に応じて、上記二本鎖の標的核酸のうちの一方に対して相補的または非相補的のいずれかとなり得、且つ上記置換対応領域と異なる塩基または塩基配列を有するもう一つの置換対応領域と、上記もう一つの置換対応領域の5'側に隣接し、上記二本鎖の標的核酸のうちの一方に対して非相補的な塩基配列を有するもう一つの非相補領域と、上記もう一つの非相補領域の5'側に隣接し、上記二本鎖の標的核酸のうちの一方に対して相補的な塩基配列を有するもう一つの相補領域とを備えている構成としてもよい。

【0036】

このことによって、置換領域の塩基または塩基配列が父親由来のものと母親由来のものと同じである(ホモ)か、あるいは異なる(ヘテロ)かを判別することができる。

【0037】

上記一本鎖の核酸と、上記もう一つの一本鎖の核酸とは、長さが互いに異なる構成としてもよい。

【0038】

上記一本鎖の核酸と、上記もう一つの一本鎖の核酸とは、互いに蛍光波長が異なる標識がなされている構成としてもよい。

【0039】

本発明の塩基種判別用プライマーは、塩基種が置換されている可能性のある置換領域を含む一本鎖の標的核酸に部分的にハイブリダイズ可能な一本鎖の核酸からなる塩基種判別用プライマーであって、上記一本鎖の核酸は、その3'末端塩基を含み、上記置換領域の塩基種に応じて、上記一本鎖の標的核酸に対して相補的または非相補的のいずれかとなり得る塩基または塩基配列を有する置換対応領域と、上記置換対応領域の5'側に隣接し、上記一本鎖の標的核酸に対して非相補的な塩基配列を有する非相補領域と、上記非相補領域の5'側に隣接し、上記一本鎖の標的核酸に対して相補的な塩基配列を有する相補領域

とを備えている。

#### 【0040】

本発明の塩基種判別用プライマーを、塩基種が置換されている可能性のある置換領域を含む一本鎖の標的核酸に作用させた場合、相補領域は、一本鎖の標的核酸にハイブリダイズする。また、非相補領域は、一本鎖の標的核酸にハイブリダイズすることができない。置換対応領域の塩基または塩基配列が、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基または塩基配列に相補的である場合、置換対応領域は一本鎖の標的核酸の置換領域にハイブリダイズする。一方、置換対応領域の塩基または塩基配列が、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基または塩基配列に非相補的である場合、核酸の置換領域にハイブリダイズできない。

#### 【0041】

一本鎖の標的核酸に対して、塩基種判別用プライマーの非相補領域が離間した状態となるものの、置換対応領域が一本鎖の標的核酸にハイブリダイズしている場合、3'末端から核酸を伸長させる酵素である核酸ポリメラーゼが、塩基種判別用プライマーの3'末端に正常に作用できる状態となる。

#### 【0042】

これに対して、一本鎖の標的核酸に対して、塩基種判別用プライマーの非相補領域および置換対応領域がいずれもハイブリダイズできず、一本鎖の標的核酸に対して非相補領域および置換対応領域が離間した状態となった場合、核酸ポリメラーゼが、塩基種判別用プライマーの3'末端に正常に作用できない。

#### 【0043】

このため、置換対応領域の塩基または塩基配列が、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基または塩基配列と相補的であり、一本鎖の核酸の置換領域にハイブリダイズする場合、プライマー伸長反応は良好に生じる。しかし、置換対応領域の塩基または塩基配列が、一本鎖の核酸の置換領域の塩基または塩基配列と非相補的であり、核酸の置換領域にハイブリダイズできない場合、プライマー伸長反応は良好に生じない。

#### 【0044】

従って、一本鎖の標的核酸の置換領域と塩基種判別用プライマーの置換対応領域とが相補的である場合と、一本鎖の標的核酸の置換領域と塩基種判別用プライマーの置換対応領域とが非相補的である場合との間での、プライマー伸長反応の進行の差が大きくなる。

#### 【0045】

そこで、プライマー伸長反応の進行の差を解析することによって、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基または塩基配列の塩基種を判別することができる。

#### 【0046】

上記置換対応領域に含まれる塩基数と上記非相補領域に含まれる塩基数との合計は、3塩基以上であることが好ましい。

#### 【0047】

このことによって、置換対応領域が、一本鎖の標的核酸の置換領域にハイブリダイズできない場合、プライマー伸長反応は生じにくくなる。従って、プライマー伸長反応の進行の差が非常に大きくなる。プライマー伸長反応の進行の差が大きくなると、プライマー伸長反応の進行の差を解析した結果にも、非常に明確な差が現れる。従って、一本鎖の標的核酸が置換領域にいかなる塩基または塩基配列を有するのかをより正確に判別することが可能である。

#### 【0048】

上記置換対応領域は、上記一本鎖の核酸の3'末端塩基のみであってもよい。

#### 【0049】

このことによって、SNPなどの一塩基対のみが置換された部位の塩基種を正確に判別することが可能である。

#### 【発明の効果】

#### 【0050】

本発明によれば、核酸中の所望の塩基の種類を、正確に且つ再現性よく判別することが

できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0051】

(実施形態1)

ASPを用いても、SNPタイピングを正確に且つ再現性よく行なうためには十分ではない場合がある。たとえASPを用いても、本来プライマー伸長反応が進行しないはずの場合に、プライマー伸長反応が起きてしまう可能性が残されている。これを解決するために、温度、時間等の反応条件をより厳密に制御する、あるいは用いるDNAポリメラーゼの種類を変更する等の作業が必要となる。さらに、そのような作業を繰り返してもなお、SNPタイピングが困難な場合もある。

【0052】

そこで、本発明者らは、プライマー伸長反応が確実に進行しない条件を調査した。具体的にはPCR法を用いて、フォワードプライマーの3'末端の、一本鎖DNAにハイブリダイズできない状態となっている塩基の数と、プライマー伸長反応の進行の程度との相関関係を調査した。

【0053】

調査方法を図5を参照しながら説明する。

【0054】

まず、図5(a)に示す工程で、標的のDNA11を含む試料溶液を調製する。続いて、DNA11を含む試料溶液に、フォワードプライマー17a、リバーズプライマー17b、DNAポリメラーゼ18および4種類のdNTPsを添加する。

【0055】

次に、図5(b)に示す工程で、DNA11を熱変性などによって一本鎖DNA13および14とする。

【0056】

次に、図5(c)に示す工程で、フォワードプライマー17aおよびリバーズプライマー17bが、一本鎖DNA14および一本鎖13にそれぞれハイブリダイズするように温度調節を行なう。

【0057】

次に、図5(d)に示す工程で、プライマー伸長反応が進行するように温度調節を行なう。

【0058】

上述の図5(b)～(d)に示す工程を繰り返し、フォワードプライマー17aとリバーズプライマー17bとに対応するDNA断片を増幅する。

【0059】

なお、本調査において、DNA11としてλDNAを、DNAポリメラーゼ18として、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有していないTaKaRa Taq(宝酒造(株))を用いた。また、本調査において用いたフォワードプライマー17aおよびリバーズプライマー17bを表1および配列表に示す。リバーズプライマー17b(配列番号9)は、表1に示すように配列番号1～8に対して共通に用いられており、完全にλDNAにハイブリダイズする塩基配列を有している。

【0060】

また、プライマー伸長反応の進行の程度を表す電気泳動の結果を図6に示す。表1に示す配列番号1～8と、配列表の配列番号1～8と、図6に示すレーン番号1～8とはそれぞれ対応している。

【0061】

【表 1】

番号	フォワードプライマー	リバースプライマー
1	λ 300-1 (配列番号 1)	λ 300-2 (配列番号 9)
2	λ 300-1mA (配列番号 2)	λ 300-2
3	λ 300-1mT (配列番号 3)	λ 300-2
4	λ 300-1m2CT (配列番号 4)	λ 300-2
5	λ 300-1m2CA (配列番号 5)	λ 300-2
6	λ 300-1m3ACT (配列番号 6)	λ 300-2
7	λ 300-1m3ACA (配列番号 7)	λ 300-2
8	λ 300-1m3ACC (配列番号 8)	λ 300-2

## 【0062】

λ DNA に完全にハイブリダイズする塩基配列を有する番号 1 のフォワードプライマーを用いた場合、図 6 のレーン 1 に示すように矢印 B で示される位置にフォワードプライマーおよびリバースプライマーに応じた DNA 断片が増幅された。

## 【0063】

3' 末端に位置する塩基のみ λ DNA にハイブリダイズしない番号 2 および 3 のフォワードプライマーを用いた場合にも、図 6 のレーン 2 および 3 に示すように、レーン 1 と全く同じ DNA 断片が増幅された。

## 【0064】

番号 4 および 5 のフォワードプライマーは共に、3' 末端から数えて 2 つの塩基が λ DNA にハイブリダイズしない塩基配列を有する。番号 5 のフォワードプライマーを用いた場合、図 6 のレーン 5 に示すように、レーン 1 と同じ DNA 断片は増幅されなかった。しかし、番号 4 のフォワードプライマーを用いた場合、レーン 1 と同じ DNA 断片が増幅された。

## 【0065】

番号 6 ~ 8 のフォワードプライマーはいずれも、3' 末端に位置する 3 塩基が λ DNA にハイブリダイズしない塩基配列を有する。番号 6 ~ 8 のフォワードプライマーを用いた場合、図 6 のレーン 6 ~ 8 に示すように、レーン 1 と同じ DNA 断片はほとんど増幅されなかった。

## 【0066】

以上の結果から、3' 末端に位置する 3 塩基が標的の核酸にハイブリダイズしないフォワードプライマーでは、プライマー伸長反応がほぼ確実に進行しないことが確認された。

## 【0067】

本発明者らは、以上の結果から、タイピングプライマーを用いて SNP タイピングを行なう際に、プライマー伸長反応がほぼ確実に進行しない条件は、タイピングプライマーの 3' 末端から数えて 3 つ以上の塩基が、標的核酸にハイブリダイズしないことであると考えた。

## 【0068】

以下に述べる本発明の実施形態は、上記考察に基づいて実施したものである。以下、本発明の実施形態を、図を参照しながら説明する。

## 【0069】

図 7 (a)、(b) および (c) は、本実施形態の塩基種判別方法において用いられる塩基種判別用プライマー (以下、タイピングプライマーと称する) を模式的に示す図である。

## 【0070】

本実施形態のタイピングプライマー 10 は、塩基種が置換されている可能性のある置換領域を含む一本鎖の標的核酸に部分的にハイブリダイズ可能な一本鎖の核酸からなる。タイピングプライマー 10 を構成する一本鎖の核酸は、図 7 (a) に示すように、置換対応領域 X と、非相補領域 Y と、相補領域 Z とを備えている。

## 【0071】

置換対応領域Xは、一本鎖の核酸の3'末端塩基を含み、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基種に応じて、一本鎖の標的核酸に対して相補的または非相補的のいずれかとなり得る塩基配列を有する。

【0072】

非相補領域Yは、置換対応領域Xの5'側に隣接し、一本鎖の標的核酸に対して非相補的な塩基配列を有する。

【0073】

相補領域Zは、非相補領域Yの5'側に隣接し、一本鎖の標的核酸に対して相補的な塩基配列を有する。

【0074】

本実施形態のタイピングプライマー10を、塩基種が置換されている可能性のある置換領域を含む一本鎖の標的核酸34および35にそれぞれ作用させた場合、図7(b)および図7(c)に示す状態となる。なお、実際のゲノムDNA等では無数のSNP部位等のような塩基が置換された領域が存在するが、ここでは一本鎖の標的核酸34および35は、それらのうちのタイピングプライマー10が結合する領域において、置換領域34rおよび35rの塩基配列の塩基種が互いに異なり、置換領域34rおよび35rを除いて互いに全く同じ塩基配列を有するものとする。

【0075】

図7(b)および図7(c)に示すように、相補領域Zは、一本鎖の標的核酸34および35にハイブリダイズする。また、非相補領域Yは、図7(b)および図7(c)に示すように、一本鎖の標的核酸34および35にハイブリダイズすることができない。置換対応領域Xの塩基配列が、一本鎖の標的核酸34の置換領域34rの塩基配列に相補的な塩基配列である場合、図7(b)に示すように、置換対応領域Xは一本鎖の標的核酸34の置換領域34rにハイブリダイズする。一方、置換対応領域Xの塩基配列が、一本鎖の標的核酸35の置換領域35rの塩基配列に非相補的な塩基配列である場合、図7(c)に示すように、一本鎖の標的核酸35の置換領域35rにハイブリダイズできない。

【0076】

図7(b)に示すように、タイピングプライマー10は、一本鎖の標的核酸34に対して非相補領域Yが離間した状態となるものの、置換対応領域Xは一本鎖の標的核酸34の置換領域34rにハイブリダイズしている。このため、3'末端から核酸を伸長させる酵素である核酸ポリメラーゼが、タイピングプライマー10の3'末端に正常に作用できる状態となる。

【0077】

これに対して、図7(c)に示すように、タイピングプライマー10が作用する一本鎖の標的核酸35に対して、タイピングプライマー10は、非相補領域Yおよび置換対応領域Xがいずれもハイブリダイズできず、一本鎖の標的核酸35に対して非相補領域Yおよび置換対応領域Xが離間した状態となる。このため、核酸ポリメラーゼが、タイピングプライマー10の3'末端に正常に作用できない。

【0078】

このため、図7(b)に示すように、置換対応領域Xの塩基配列が、一本鎖の標的核酸34の置換領域34rの塩基配列と相補的な塩基配列であり、一本鎖の標的核酸34の置換領域34rにハイブリダイズする場合、プライマー伸長反応は良好に生じる。しかし、図7(c)に示すように、置換対応領域Xが、一本鎖の標的核酸35の置換領域35rの塩基配列と非相補的な塩基を有しており、一本鎖の標的核酸35の置換領域35rにハイブリダイズできない場合、プライマー伸長反応は良好に生じない。

【0079】

従って、図7(b)に示す、一本鎖の標的核酸34の置換領域34rとタイピングプライマー10の置換対応領域Xとが相補的な場合と、図7(c)に示す、一本鎖の標的核酸35の置換領域35rとタイピングプライマー10の置換対応領域Xとが非相補的な場合との間での、プライマー伸長反応の進行の差が大きくなる。

**【0080】**

そこで、プライマー伸長反応の進行の差を解析することによって、一本鎖の標的核酸 34 および 35 のそれぞれの置換領域 34 r および 35 r の塩基配列の塩基種を判別することができる。

**【0081】**

次に、上記タイピングプライマー 10 を用いて、塩基種が置換されている可能性のある置換領域を含む一本鎖の標的核酸において、置換領域の塩基配列の塩基種を判別する方法を、図 8 (a) ~ 図 8 (d) および図 9 (a) ~ 図 9 (d) を参照しながら説明する。図 8 (a) ~ 図 8 (d) および図 9 (a) ~ 図 9 (d) は、本実施形態の一本鎖の標的核酸が有する置換領域の塩基配列の塩基種を、PCR 法を利用して判別する方法の各工程を表す図である。

**【0082】**

まず、図 8 (a) に示す工程で、置換領域 34 r および 44 r を有する標的の核酸 36 を含む試料溶液を調製する。続いて、核酸 36 を含む試料溶液に、タイピングプライマー 10、リバースプライマー 20、核酸ポリメラーゼ 30 および 4 種類の dNTPs を添加する。同様に、図 9 (a) に示す工程で、置換領域 35 r および 45 r を有する標的の核酸 38 を含む試料溶液を調製する。続いて、核酸 38 を含む試料溶液に、タイピングプライマー 10、リバースプライマー 20、核酸ポリメラーゼ 30 および 4 種類の dNTPs を添加する。なお、実際のゲノム DNA 等では無数の SNP 部位のような塩基が置換された領域が存在するが、ここでは標的の核酸 36 および 38 は、それらのうちのタイピングプライマー 10 およびリバースプライマー 20 が結合する領域において、置換領域 34 r および 44 r の塩基配列と、置換領域 35 r および 45 r の塩基配列との塩基種が互いに異なり、標的の核酸 36 と核酸 38 とは、置換領域 34 r および 44 r と、置換領域 35 r および 45 r とを除いて互いに全く同じ塩基配列を有するものとする。

**【0083】**

次に、図 8 (b) に示す工程で、核酸 36 を熱変性などによって一本鎖の標的核酸 34 a および 44 a とする。同様に、図 9 (b) に示す工程で、核酸 38 を熱変性などによって一本鎖の標的核酸 34 b および 44 b とする。

**【0084】**

次に、図 8 (c) に示す工程で、タイピングプライマー 10 およびリバースプライマー 20 が、一本鎖の標的核酸 34 a および一本鎖の標的核酸 44 a にそれぞれハイブリダイズするように温度調節を行なう。このとき、タイピングプライマー 10 の相補領域 Z が、一本鎖の標的核酸 34 a にハイブリダイズする。また、タイピングプライマー 10 の置換対応領域 X が、一本鎖の標的核酸 34 a の置換領域 35 a にハイブリダイズする。一方、図 9 (c) に示す工程でも同様に、タイピングプライマー 10 およびリバースプライマー 20 が、一本鎖の標的核酸 34 b および一本鎖の標的核酸 44 b にそれぞれハイブリダイズするように温度調節を行なう。このとき、タイピングプライマー 10 の相補領域 Z のみが、一本鎖の標的核酸 34 b にハイブリダイズする。

**【0085】**

次に、図 8 (d) に示す工程で、プライマー伸長反応が進行するように温度調節を行なう。このとき、タイピングプライマー 10 の置換対応領域 X が一本鎖の標的核酸 34 a の置換領域 35 a にハイブリダイズしているので、プライマー伸長反応が進行し、核酸ポリメラーゼ 30 によって dNTPs が消費される。

**【0086】**

一方、図 9 (d) に示す工程でも同様に、プライマー伸長反応が進行するように温度調節を行なう。しかしながら、置換対応領域 X が、一本鎖の標的核酸 34 b の置換領域 35 b にハイブリダイズできないので、プライマー伸長反応が正常に進行しにくい。

**【0087】**

本実施形態では、PCR 法の手順に基づいて、図 8 (b) ~ (d) に示す工程、ならびに図 9 (b) ~ (d) に示す工程をそれぞれ繰り返す。



## 【0088】

以上の工程を実施した後、プライマー伸長反応の進行の差（特に本実施形態では、増幅された核酸の量の差）を解析することによって、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基配列の塩基種を判別することができる。

## 【0089】

特に、上述のプライマー伸長反応がほぼ確実に進行しない条件の考察から、図9(c)に示す工程において、タイピングプライマー10のハイブリダイズしない塩基の数（すなわち、置換対応領域Xに含まれる塩基数と非相補領域Yに含まれる塩基数との合計）が3塩基以上とすることが好ましい。このことによって、置換対応領域Xが、一本鎖の標的核酸34bの置換領域35bにハイブリダイズできない場合、プライマー伸長反応は生じにくくなる。従って、プライマー伸長反応の進行の差が非常に大きくなる。

## 【0090】

プライマー伸長反応の進行の差が大きくなると、プライマー伸長反応の進行の差を解析した結果にも、非常に明確な差が現れる。従って、一本鎖の核酸が置換領域35aおよび35bのいずれの塩基配列を有するのかをより正確に判別することが可能である。

## 【0091】

本実施形態では、タイピングプライマー10からのプライマー伸長反応を、PCR法を利用して行なったが、これに限定されず、SDA、RCR、LAMPおよびTMA反応等の特定の塩基配列の核酸を増幅する方法を利用することができる。プライマー伸長反応の進行の差を解析する方法は、上記の方法により増幅された核酸を電気泳動等の方法で解析する方法、上記の方法の過程で生成されるピロリン酸等の量を解析する方法が挙げられる。

## 【0092】

なお、ここではリバースプライマー20を添加する方法を説明したが、これに限られない。例えば、リバースプライマー20を添加せずに、タイピングプライマー10からのプライマー伸長反応のみを行ない、プライマー伸長反応の過程で生成されるピロリン酸等の量を解析してもよい。

## 【0093】

また、上述の方法に特に限られることはなく、正確にプライマー伸長反応の進行の差を解析できる方法であれば用いることが可能である。

## 【0094】

なお、タイピングプライマー10を構成する核酸としては、DNAが好ましい。DNAは、化学的に非常に安定であり、取り扱いも簡単で、入手も容易だからである。勿論、必要に応じてチオールDNA、RNAなどを用いてタイピングプライマー10を作製してもよい。

## 【0095】

タイピングプライマー10がDNAで構成されている場合、核酸ポリメラーゼとして、DNAポリメラーゼを用いる必要がある。DNAポリメラーゼには、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するものと有さないものがあるが、本実施形態ではDNAポリメラーゼとして3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が実質的に無い（3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有さない、あるいは有していてもその活性が非常に弱い）ものを用いることが好ましい。その理由としては、本実施形態におけるタイピングプライマー10を用いた場合、前述の通り、置換対応領域Xが一本鎖の標的核酸34bの置換領域35bとが非相補的であるので、タイピングプライマー10の置換対応領域Xおよび非相補領域Yのヌクレオチドが一本鎖の標的核酸に対してハイブリダイズできずに浮いたような状態となる。このような場合、通常、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が実質的に無いDNAポリメラーゼは正常なプライマー伸長反応を起こせない。しかし、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の強いDNAポリメラーゼを用いると、その活性により、置換対応領域Xおよび非相補領域Yのヌクレオチドを切断した後に、プライマー伸長反応を進行させてしまうことがある。従って、一本鎖の標的核酸の置換領域の正確な塩基種の判別が不可能となるおそれがあるから



である。

#### 【0096】

そこで具体的には、TaKaRa Taq (宝酒造 (株) 製)、やrTaq DNA POLYMERASE (東洋紡 (株) 製)、Taq DNA POLYMERASE (Amersham Pharmacia Biotech製)、Tfl DNA POLYMERASE (promega製)、Hot Tub DNA POLYMERASE (Amersham Pharmacia Biotech製)、Tth DNA POLYMERASE (東洋紡 (株) 製)、rTth DNA POLYMERASE (TOYOBO, PE Biosystems製)、Ampli Taq DNA POLYMERASE (アプライドバイオシステムズ製等のDNAポリメラーゼを用いることが好ましい。このことによって、上述のようなおそれが無くなり、一本鎖の標的核酸の置換領域のより正確な塩基種の判別を行なうことができる。

#### 【0097】

(実施形態2)

本実施形態では、上記実施形態1で説明したタイピングプライマー10のうち、特にSNPタイピングに適したタイピングプライマーを説明する。

#### 【0098】

SNPは、ゲノムDNAの塩基配列中のある特定部位に観察される一塩基対の相違 (置換) である。置換対応領域Xが3'末端塩基のみであるタイピングプライマー10を用いることによって、正確なSNPタイピングが可能である。

#### 【0099】

ここで具体的に、SNPタイピングに用いるタイピングプライマーを、図10(a)～図10(c)を参照しながら説明する。図10(a)～図10(c)は、SNPタイピングに用いるタイピングプライマーの構成を表す図である。

#### 【0100】

SNPタイピングに用いるタイピングプライマー10'は、一本鎖のDNAからなる。また、タイピングプライマー10'では、その3'末端に位置する塩基 (図中N1) が、一本鎖の標的核酸54および56のSNP部位の塩基S1およびS2に対応する。また、タイピングプライマー10'の3'末端から数えて2番目 (図中N2) および3番目 (図中N3) の塩基は、それぞれ一本鎖の標的核酸54および56のSNP部位から3'方向に数えて2番目および3番目の塩基に対して必ず非相補的であり、さらに、タイピングプライマー10'の3'末端から数えて4番目から5'末端までの塩基配列は、一本鎖の標的核酸54および56のSNP部位から3'方向に数えて4番目から3'側への塩基配列に対して相補的であるように設計されている。

#### 【0101】

ここで、塩基N1と塩基S1とが相補的であり、塩基N1と塩基S2とは非相補的であると仮定する。また、タイピングプライマー10'が一本鎖のDNAからなるので、プライマー伸長反応を生じさせるためには、核酸ポリメラーゼとしてDNAポリメラーゼを用いる。

#### 【0102】

図10(b)に示すように、SNP部位の塩基がS1である一本鎖の標的核酸54に対して、タイピングプライマー10'の3'末端から数えて2番目および3番目の塩基N2およびN3はハイブリダイズできないが、3'末端塩基N1は、一本鎖の標的核酸54のSNP部位の塩基S1にハイブリダイズする。このため、DNAポリメラーゼ28が、タイピングプライマー10'の3'末端に正常に作用できる。従って、プライマー伸長反応が良好に進行する。

#### 【0103】

一方、図10(c)に示すように、SNP部位の塩基がS2である一本鎖の標的核酸56に対して、タイピングプライマー10'の3'末端塩基N1、3'末端から数えて2番目および3番目の塩基N2およびN3の全てはハイブリダイズできない。このため、DNA

ポリメラーゼ28が、タイピングプライマー10'の3'末端に正常に作用できず、プライマー伸長反応が正常に進行しにくい。

#### 【0104】

すなわち、図10(b)に示すように、タイピングプライマー10'の3'末端塩基と、一本鎖の標的核酸54のSNP部位の塩基とが相補的な関係であればプライマー伸長反応は良好に起こるが、図10(c)に示すように、タイピングプライマー10'の3'末端塩基と、一本鎖の標的核酸56のSNP部位の塩基とが非相補的であればプライマー伸長反応はほとんど進行しない。

#### 【0105】

タイピングプライマー10に代えて、上記のように設計されたタイピングプライマー10'を用いて、上記実施形態1で述べた置換領域の塩基配列の塩基種を判別する方法を同様に行なった後、プライマー伸長反応の進行の差を解析すれば、正確なSNPタイピングが可能となる。従って、プライマー伸長反応の進行の差を解析することによって、一本鎖の標的核酸のSNP部位の塩基配列の塩基種を判別することができる。

#### 【0106】

また、本実施形態におけるタイピングプライマーを用いればSNPタイピングのみならず、突然変異等による一塩基変異の解析やあるいはそれらに限られず所望の一塩基の種類を決定することも可能である。

#### 【0107】

(実施形態3)

ヒトなどの高等生物のゲノムは、父親由来のものと母親由来のものから成っている。このため、SNPタイピングにおいて、SNP部位の塩基が父親由来のものと母親由来のもので同じである(ホモ)か、あるいは異なる(ヘテロ)かを判別することも非常に重要となっている。このようなSNPタイピングにも、上記実施形態2のタイピングプライマーを用いることができる。

#### 【0108】

例えば、ヒトから採取された試料において、一本鎖の標的核酸におけるSNP部位の塩基がチミン(以下、Tと記す)かシトシン(以下、Cと記す)である場合を説明する。

#### 【0109】

このとき、考えられるSNPパターンはT/Tのホモ、C/Cのホモ、そしてT/Cのヘテロの3通りである。これらを判別するために、SNP部位の塩基がTの場合のみにプライマー伸長反応が進行するタイピングプライマー(タイピングプライマーAとする)と、Cの場合のみにプライマー伸長反応が進行するタイピングプライマー(タイピングプライマーBとする)とを用いて、それぞれPCR反応を行なう。なお、このとき、タイピングプライマーAおよびBは、いずれも上記実施形態2に示したタイピングプライマー10'と全く同様に設計されており、リバースプライマーは同一のものが用いられる。

#### 【0110】

次に、それぞれのDNA断片について電気泳動等による解析を行えば、SNPパターンのタイピングが可能となる。

#### 【0111】

具体的には、タイピングプライマーAを用いたときにのみDNA断片の増幅が認められた場合のSNPパターンはT/T、タイピングプライマーBを用いたときにのみDNA断片の増幅が認められた場合のSNPパターンはC/C、両方のタイピングプライマーを用いてDNA断片の増幅が認められた場合のSNPパターンはT/Cと判別することができる。

#### 【0112】

また、上記のタイピングプライマーAおよびタイピングプライマーBのそれぞれの相補領域Xの長さを互いに異なるように設計すれば、タイピングプライマーAとリバースプライマーとから増幅されるDNA断片と、タイピングプライマーBとリバースプライマーとから増幅されるDNA断片とは、互いに異なる長さとなる。このため、両者のDNA断片

は、同時に電気泳動を行なっても重複することがない。従って、タイピングプライマーAとタイピングプライマーBとを同時に混合し、リバープライマーを用いてPCR反応を行なった後、電気泳動等により解析を行なうことによって、迅速にSNPパターンのタイピングが可能となる。

#### 【0113】

あるいは、上記のタイピングプライマーAおよびタイピングプライマーBのそれぞれに互いに蛍光波長が異なる標識を行なえば、タイピングプライマーAとリバープライマーとから増幅されるDNA断片と、タイピングプライマーBとリバープライマーとから増幅されるDNA断片とは、異なる波長の蛍光を発する。このため、それぞれのDNA断片を個別に検出することができる。従って、タイピングプライマーAとタイピングプライマーBとを同時に混合し、リバープライマーを用いてPCR反応を行なった後、電気泳動等によって増幅されたDNA断片を単離し、その蛍光波長を解析することによって、迅速にSNPパターンをタイピングすることができる。

#### 【0114】

さらに、上記のタイピングプライマーAのみを用いて、同様にSNPパターンのタイピングを行なうことも可能である。

#### 【0115】

具体的には、タイピングプライマーAとリバープライマーとを用いてPCR反応を行ない、その後電気泳動等で解析する。SNPパターンがT/Tの場合とT/Cの場合はDNA断片の増幅が確認されるが、C/Cの場合はDNA断片の増幅がほとんど確認されない。そしてさらに、SNPパターンがT/Tの場合は、SNPパターンがT/Cの場合と比べて、PCR反応における鋳型となるSNP部位の塩基がTである一本鎖の標的核酸の量が2倍となるので、DNA断片が増幅の程度が明らかに大きくなる。従って、DNA断片の増幅量を解析することによって、SNP部位のSNPパターンをタイピングすることが可能となる。

#### 【0116】

また、SNP部位の塩基種が3種類あるいは4種類の可能性がある場合でも、それに対応して、3'末端に位置する塩基N1が3種類あるいは4種類の上記実施形態2のタイピングプライマーを用いれば、SNPタイピングすることが可能である。

#### 【実施例】

##### 【0117】

##### (実施例1)

実施例1では、ヒトの血液より抽出したゲノムDNA溶液を用いて、ADH2遺伝子中に見られるSNPのタイピングを試みた。本実施例において解析対象としたSNP部位およびその周辺のゲノムDNAの塩基配列を配列番号10に示す。SNP部位は、配列番号10の46番目の塩基(rで記された部位)であり、AあるいはGの可能性がある。このとき、考えられるSNPパターンはA/Aのホモ、G/Gのホモ、そしてA/Gのヘテロの3通りである。

##### 【0118】

まず、上記のSNPパターンがそれぞれA/A、A/G、G/Gであることが予め分かっている3人の被験者の血液から、Genとるくん<sup>TM</sup>(血液用)(宝酒造(株)製)を用いて、SNPパターンがA/AのゲノムDNA(以下、A/AゲノムDNAと記す)、SNPパターンがA/GのゲノムDNA(以下、A/GゲノムDNAと記す)、SNPパターンがG/GのゲノムDNA(以下、G/GゲノムDNAと記す)を抽出した。

##### 【0119】

次に、配列番号11および12に示した2種類のタイピングプライマーと、配列番号13に示した1種類のリバープライマーとを用いてPCR反応液1~6を調製しPCR反応を行った。各PCR反応液の組成は表2~7に記す通りである。また、PCR反応の条件は、図11に示すとおりであり、このときの繰り返し回数は20回である。

##### 【0120】

【表 2】

PCR反応液1:

内容物 (濃度)	体積
A/AゲノムDNA (100ng/μl)	1μl
TaKaRa Taq™ (5U/μl)	0.1μl
10×PCR buffer	2μl
dNTPs (2.5mM)	1.6μl
配列番号11のタイピングプライマー (20μM)	0.9μl
配列番号13のリバースプライマー (20μM)	0.9μl
蒸留水	13.5μl

【0121】

【表 3】

PCR反応液2:

内容物 (濃度)	体積
A/AゲノムDNA (100ng/μl)	1μl
TaKaRa Taq™ (5U/μl)	0.1μl
10×PCR buffer	2μl
dNTPs (2.5mM)	1.6μl
配列番号12のタイピングプライマー (20μM)	0.9μl
配列番号13のリバースプライマー (20μM)	0.9μl
蒸留水	13.5μl

【0122】

【表 4】

PCR反応液3:

内容物 (濃度)	体積
A/GゲノムDNA (100ng/μl)	1μl
TaKaRa Taq™ (5U/μl)	0.1μl
10×PCR buffer	2μl
dNTPs (2.5mM)	1.6μl
配列番号11のタイピングプライマー (20μM)	0.9μl
配列番号13のリバースプライマー (20μM)	0.9μl
蒸留水	13.5μl

【0123】

【表 5】

PCR反応液4:

内容物 (濃度)	体積
A/GゲノムDNA (100ng/μl)	1μl
TaKaRa Taq™ (5U/μl)	0.1μl
10×PCR buffer	2μl
dNTPs (2.5mM)	1.6μl
配列番号12のタイピングプライマー (20μM)	0.9μl
配列番号13のリバースプライマー (20μM)	0.9μl
蒸留水	13.5μl

【0124】

【表 6】

PCR反応液 5:

内容物 (濃度)	体積
G/GゲノムDNA (100ng/μl)	1 μl
TaKaRa Taq™ (5U/μl)	0.1 μl
10×PCR buffer	2 μl
dNTPs (2.5mM)	1.6 μl
配列番号 11 のタイピングプライマー (20 μM)	0.9 μl
配列番号 13 のリバースプライマー (20 μM)	0.9 μl
蒸留水	13.5 μl

【0125】

【表 7】

PCR反応液 6:

内容物 (濃度)	体積
G/GゲノムDNA (100ng/μl)	1 μl
TaKaRa Taq™ (5U/μl)	0.1 μl
10×PCR buffer	2 μl
dNTPs (2.5mM)	1.6 μl
配列番号 12 のタイピングプライマー (20 μM)	0.9 μl
配列番号 13 のリバースプライマー (20 μM)	0.9 μl
蒸留水	13.5 μl

【0126】

上記PCR反応後、3%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

【0127】

目的のDNA断片の増幅が認められたのは、PCR反応液1、3、4、6であった。一方、PCR反応液2および5に関してはほとんど増幅は確認されなかった。つまり、A/AゲノムDNAに関して、配列番号11のタイピングプライマーを用いたときにのみ増幅が確認された。逆に、G/GゲノムDNAに関して、配列番号12のタイピングプライマーを用いたときにのみ増幅が確認された。また、A/GゲノムDNAに関して、いずれのタイピングプライマーを用いた場合にも増幅が確認された。

【0128】

従って、上記の配列番号11および12のタイピングプライマーを用いることによって、SNP部位の塩基を判別できることが確認できた。

【0129】

また、DNA断片の増幅量は、PCR反応液1および6がほぼ同程度であり、PCR反応液3および4は、PCR反応液1および6に比べ明らかに少ないという結果であった。このように、PCR反応液1および3では、同じタイピングプライマーが用いられているにも関わらず、DNA断片の増幅量に明らかな差が認められるのは、PCR反応における鋳型となるSNP部位の塩基がAであるゲノムDNAの量がPCR反応液1の方がPCR反応液3の2倍であるからである。

【0130】

この結果は、DNA断片の増幅量の差からも、ゲノムDNAのSNPパターンがホモであるかヘテロであるかを解析することが可能であることを示している。従って、本実施例において、仮に配列番号11および12のタイピングプライマーのいずれか一方のみを用いたとしても、DNA断片の増幅の有無だけでなく、増幅量も解析することによって、A/A、A/G、G/Gの三種類のSNPパターンをタイピングすることが可能である。

【0131】

以上の結果は、本発明のタイピングプライマーを用いることでSNPタイピングができることを示している。

【0132】

## 【実施例 2】

本実施例では、上記実施例 1 と同じゲノム DNA を解析対象サンプルとし、異なる長さの 2 種類のタイピングプライマーを用いて SNP タイピングを試みた。解析する SNP 部位は上記実施例 1 と同じである。

## 【0133】

本実施例では、タイピングプライマーとして、実施例 1 で用いた配列番号 11 のタイピングプライマー 1 の 5' 末端が 6 F AM で標識されたタイピングプライマー（以下、標識プライマー C と記す）、配列番号 14 に示すポリヌクレオチドの 5' 末端が 6 F AM で標識されたタイピングプライマー（以下、標識プライマー D と記す）、および配列番号 15 に示したリバースプライマーのそれぞれについて、プライマー溶液（各 20  $\mu$ M）を調製した。

## 【0134】

ここで、標識プライマー C と、配列番号 15 に示したリバースプライマーとの両プライマーから PCR によって増幅される DNA 断片の全長は 60 bp となる。一方、標識プライマー D と配列番号 15 に示したリバースプライマーとの両プライマーから PCR によって増幅される DNA 断片の全長は 62 bp となる。

## 【0135】

次に、標識プライマー C および D と、配列番号 15 に示したリバースプライマーとを用いて PCR 反応液 7～9 を調製し PCR 反応を行った。各 PCR 反応液の組成は表 8～10 に記す通りである。また、PCR 反応の条件は、実施例 1 と同様に、図 11 に示すとおりであり、このときの繰り返し回数は 20 回である。

## 【0136】

## 【表 8】

PCR 反応液 7:

内容物 (濃度)	体積
A/G ゲノム DNA (100 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
TaKaRa Taq™ (5 U/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l
10×PCR buffer	2 $\mu$ l
dNTPs (2.5 mM)	1.6 $\mu$ l
標識プライマー C (20 $\mu$ M)	0.9 $\mu$ l
標識プライマー D (20 $\mu$ M)	0.9 $\mu$ l
配列番号 15 のリバースプライマー (20 $\mu$ M)	0.9 $\mu$ l
蒸留水	12.6 $\mu$ l

## 【0137】

## 【表 9】

PCR 反応液 8:

内容物 (濃度)	体積
A/G ゲノム DNA (100 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
TaKaRa Taq™ (5 U/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l
10×PCR buffer	2 $\mu$ l
dNTPs (2.5 mM)	1.6 $\mu$ l
標識プライマー C (20 $\mu$ M)	0.9 $\mu$ l
標識プライマー D (20 $\mu$ M)	0.9 $\mu$ l
配列番号 15 のリバースプライマー (20 $\mu$ M)	0.9 $\mu$ l
蒸留水	12.6 $\mu$ l

## 【0138】

【表10】

PCR反応液9:

内容物(濃度)	体積
G/GゲノムDNA (100ng/μl)	1 μl
TaKaRa Taq™ (5U/μl)	0.1 μl
10×PCR buffer	2 μl
dNTPs (2.5mM)	1.6 μl
標識プライマーC (20μM)	0.9 μl
標識プライマーD (20μM)	0.9 μl
配列番号15のリバースプライマー (20μM)	0.9 μl
蒸留水	12.6 μl

## 【0139】

上記PCR反応後、各PCR反応液についてジェネティックアナライザ ABI PRISM 310 (アプライドバイオシステムズジャパン (株) 製) により解析を行った。

## 【0140】

その結果、PCR反応液7については60bpからなるDNA断片が優位に増幅されたことを示すピークが認められたのに対し、62bpからなるDNA断片の増幅を示すピークはほとんど認められなかった。逆に、PCR反応液9に関しては62bpからなる塩基配列の増幅を示すピークが認められたが、60bpからなる塩基配列の増幅を示すピークはほとんど認められなかった。一方、PCR反応液8に関しては60bpからなる塩基配列と62bpからなる塩基配列の両方のピークが確認された。

## 【0141】

従って、上記標識プライマーCおよびDを用いることによって、本実施例におけるSNP部位についてA/A、A/G、G/Gの三種類のSNPパターンを正確にタイピングすることが可能であることが確認された。

## 【0142】

(実施例3)

本実施例では、上記実施例1と同じゲノムDNAおよびタイピングプライマーを用いてPCR反応を行った後に、そのPCR反応液中のピロリン酸量をルシフェラーゼ反応を用いて解析することによって、SNP部位の塩基種のタイピングを行なうことを試みた。

## 【0143】

そこでまず、実施例1と同様にPCR反応液1～6を調製しPCR反応を行った。

## 【0144】

次に、PCR後の各PCR反応液中に含まれているピロリン酸量について、Mostafa Ronaghiらの方法 (Ronaghi, M., Uhlen, M. and Nyren, P. (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. Science, 281, 363-365.) に準じて解析した。ルシフェラーゼ反応による発光強度の解析については、AQUACOSMOS/VIMシステム (浜松ホトニクス (株) 製) を用いて行った。その結果を図12に示す。

## 【0145】

図12では、PCR反応液1の場合の発光強度を100%とし、他の各PCR反応液の発光強度を、PCR反応液1の場合に対する割合 (= (各PCR反応液の発光強度/PCR反応液1の発光強度) × 100) で表している。

## 【0146】

図12に示すように、PCR反応液1と6とが、ほぼ同等の発光強度を示すことが認められた。またPCR反応液3および4についてもほぼ同等の発光強度が認められたが、PCR反応液1および6と比較すると、明らかにその発光強度は小さかった。また、PCR反応液2および5に関してはほとんど発光は認められなかった。

## 【0147】

つまり、A/AゲノムDNAに関して、配列番号11のタイピングプライマーを用いたときだけ発光が認められ、逆にG/GゲノムDNAに関して、配列番号12のタイピングプライマーを用いたときだけ発光が認められた。一方、A/GゲノムDNAに関して、配列番号11および12のタイピングプライマーのいずれを用いた場合においても発光が認められたものの、その強度は上記の二パターンの場合に比べ明らかに小さいものであった。

#### 【0148】

従って、本実施例において、上記タイピングプライマーを用いてPCR反応およびルシフェラーゼ反応を介してその発光の有無を解析することで解析対象SNP部位のタイピングをすることができた。

#### 【0149】

また、上記のようにA/GゲノムDNAに関して、配列番号11および12のタイピングプライマーを用いた場合の発光強度が、A/AゲノムDNAに関して配列番号11のタイピングプライマーを用いた場合や、G/GゲノムDNAに関して配列番号12のタイピングプライマーを用いた場合に比べて明らかに小さかった理由は、A/AゲノムDNAおよびG/GゲノムDNAでは、PCR反応における鋳型となるSNP部位の塩基がAまたはGであるゲノムDNAの量が、A/GゲノムDNAの2倍であるからである。

#### 【0150】

従って、発光の有無だけではなく、発光強度の定量的な解析を行なうことによって、配列番号11および12のタイピングプライマーのいずれかを一方のみを用いた場合でも、SNPタイピングが可能であることが確認できた。

#### 【0151】

##### (実施例4)

本実施例では、ヒトの血液より抽出したゲノムDNA溶液を用いて、Carbohydrate sulfotransferase 2 遺伝子中に見られるSNPのタイピングを試みた。本実施例において、解析対象としたSNP部位およびその周辺のゲノムDNAの塩基配列を配列番号16に示す。SNP部位は、配列番号16の37番目の塩基（sで記された部位）であり、GあるいはCの可能性がある。

#### 【0152】

まず、上記のSNPパターンがそれぞれG/G、G/C、C/Cであることが予め分かっている3人の被験者の血液から、Genとるくん<sup>TM</sup>（血液用）（宝酒造（株）製）を用いて、SNPパターンがG/GのゲノムDNA（以下、G/GゲノムDNAと記す）、SNPパターンがG/CのゲノムDNA（以下、G/CゲノムDNAと記す）、SNPパターンがC/CのゲノムDNA（以下、C/CゲノムDNAと記す）を抽出した。

#### 【0153】

次に、配列番号17に示したプライマーと、配列番号18に示したリバースプライマーとを用いてPCR反応液10～12を調製しPCR反応を行った。各PCR反応液の組成は表11～13に示す通りである。また、PCR反応の条件は、図11に示すとおりであり、このときの繰り返し回数は35回である。

#### 【0154】

##### 【表11】

##### PCR反応液10:

内容物 (濃度)	体積
G/GゲノムDNA (100ng/μl)	1μl
TaKaRa Taq <sup>TM</sup> (5U/μl)	0.1μl
10×PCR buff r	2μl
dNTPs (2.5mM)	1.6μl
配列番号17のプライマー (20μM)	0.9μl
配列番号18のリバースプライマー (20μM)	0.9μl
蒸留水	13.5μl



【0155】

【表12】

PCR反応液11:

内容物 (濃度)	体積
G/CゲノムDNA (100ng/μl)	1μl
TaKaRa Taq™ (5U/μl)	0.1μl
10×PCR buffer	2μl
dNTPs (2.5mM)	1.6μl
配列番号17のプライマー (20μM)	0.9μl
配列番号18のリバースプライマー (20μM)	0.9μl
蒸留水	13.5μl

【0156】

【表13】

PCR反応液12:

内容物 (濃度)	体積
C/CゲノムDNA (100ng/μl)	1μl
TaKaRa Taq™ (5U/μl)	0.1μl
10×PCR buffer	2μl
dNTPs (2.5mM)	1.6μl
配列番号17のプライマー (20μM)	0.9μl
配列番号18のリバースプライマー (20μM)	0.9μl
蒸留水	13.5μl

【0157】

次に、上記PCR反応後のPCR反応液10～12のそれぞれを、SUPREC™-PCR (宝酒造 (株) 製) を用いて精製した。これらについて、配列番号19および20に示したタイピングプライマーを用いてプライマー伸長反応液1～6を調製し、プライマー伸長反応を行った。各プライマー伸長反応液の組成は表14～19に示す通りである。また、プライマー伸長反応の条件は、図13に示すとおりである。

【0158】

【表14】

プライマー伸長反応液1:

内容物 (濃度)	体積
前製済みPCR反応液10	10μl
プラチナTaqDNAポリメラーゼ (5U/μl)	0.1μl
10×PCR buffer、Minus Mg	2μl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.8μl
dNTPs (2.5mM)	1.6μl
配列番号19のタイピングプライマー (20μM)	0.9μl
蒸留水	4.6μl

【0159】

【表15】

プライマー伸長反応液2:

内容物 (濃度)	体積
前製済みPCR反応液10	10μl
プラチナTaqDNAポリメラーゼ (5U/μl)	0.1μl
10×PCR buffer、Minu Mg	2μl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.8μl
dNTPs (2.5mM)	1.6μl
配列番号20のタイピングプライマー (20μM)	0.9μl
蒸留水	4.6μl

【0160】

【表16】

プライマー伸長反応液3:

内容物 (濃度)	体積
精製済みPCR反応液11	10 $\mu$ l
プラチナTaqDNAポリメラーゼ (5U/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l
10 $\times$ PCR buffer、Minus Mg	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.8 $\mu$ l
dNTPs (2.5mM)	1.6 $\mu$ l
配列番号19のタイピングプライマー (20 $\mu$ M)	0.9 $\mu$ l
蒸留水	4.6 $\mu$ l

【0161】

【表17】

プライマー伸長反応液4:

内容物 (濃度)	体積
精製済みPCR反応液11	10 $\mu$ l
プラチナTaqDNAポリメラーゼ (5U/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l
10 $\times$ PCR buffer、Minus Mg	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.8 $\mu$ l
dNTPs (2.5mM)	1.6 $\mu$ l
配列番号20のタイピングプライマー (20 $\mu$ M)	0.9 $\mu$ l
蒸留水	4.6 $\mu$ l

【0162】

【表18】

プライマー伸長反応液5:

内容物 (濃度)	体積
精製済みPCR反応液12	10 $\mu$ l
プラチナTaqDNAポリメラーゼ (5U/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l
10 $\times$ PCR buffer、Minus Mg	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.8 $\mu$ l
dNTPs (2.5mM)	1.6 $\mu$ l
配列番号19のタイピングプライマー (20 $\mu$ M)	0.9 $\mu$ l
蒸留水	4.6 $\mu$ l

【0163】

【表19】

プライマー伸長反応液6:

内容物 (濃度)	体積
精製済みPCR反応液12	10 $\mu$ l
プラチナTaqDNAポリメラーゼ (5U/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l
10 $\times$ PCR buffer、Minus Mg	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.8 $\mu$ l
dNTPs (2.5mM)	1.6 $\mu$ l
配列番号20のタイピングプライマー (20 $\mu$ M)	0.9 $\mu$ l
蒸留水	4.6 $\mu$ l

【0164】

プライマー伸長反応後、各プライマー伸長反応液中に含まれているピロリン酸量について、実施例3と同様にルシフェラーゼ反応を介して解析した。その結果を図14に示す。

【0165】

図14では、プライマー伸長反応液1の場合の発光強度を100%とし、他の各プライマー伸長反応液の発光強度を、プライマー伸長反応液1の場合に対する割合 (= (各プラ

イマー伸長反応液の発光強度／プライマー伸長反応液 1 の発光強度) × 100) で表している。

【0166】

図 14 に示すように、プライマー伸長反応液 1 と 6 とが、ほぼ同等の発光強度を示すことが認められた。またプライマー伸長反応液 3 および 4 についてもほぼ同等の発光強度が認められたが、プライマー伸長反応液 1 および 6 と比較すると、明らかにその発光強度は小さかった。また、プライマー伸長反応液 2 および 5 に関してはほとんど発光は認められなかった。

【0167】

つまり、G/G ゲノム DNA に関して、配列番号 19 のタイピングプライマーを用いたときだけ発光が認められ、逆に C/C ゲノム DNA に関して、配列番号 20 のタイピングプライマーを用いたときだけ発光が認められた。一方、G/C ゲノム DNA に関して、配列番号 19 および 20 のタイピングプライマーのいずれを用いた場合においても発光が認められたものの、その強度は上記の二パターンの場合に比べ明らかに小さいものであった。

【0168】

従って、本実施例において、上記タイピングプライマーを用いてプライマー伸長反応およびルシフェラーゼ反応を介してその発光の有無を解析することで解析対象 SNP 部位のタイピングをすることができた。

【0169】

また、上記のように G/C ゲノム DNA に関して、配列番号 19 および 20 のタイピングプライマーを用いた場合の発光強度が、G/G ゲノム DNA に関して配列番号 19 のタイピングプライマーを用いた場合や、C/C ゲノム DNA に関して配列番号 20 のタイピングプライマーを用いた場合に比べて明らかに小さかった理由は、G/G ゲノム DNA および C/C ゲノム DNA では、プライマー伸長反応液における鋳型となる SNP 部位の塩基が G または C であるゲノム DNA の量が、G/C ゲノム DNA の 2 倍であるからである。

【0170】

従って、発光の有無だけではなく、発光強度の定量的な解析を行なうことによって、配列番号 19 および 20 のタイピングプライマーのいずれかを一方のみを用いた場合でも、SNP タイピングが可能であることが確認できた。

【0171】

(実施例 5)

本実施例 5 では、実施例 1 と同じゲノム DNA およびプライマーを用いて PCR 反応を行った後に、その PCR 反応液中のピロリン酸を  $H^+$ -ピロホスファターゼを用いて解析することで実施例 1 と同じ解析対象 SNP 部位のタイピングを行なうことを試みた。

【0172】

図 15 は、 $H^+$ -ピロホスファターゼを模式的に表す図である。

【0173】

図 15 に示すように、 $H^+$ -ピロホスファターゼは通常、植物の液胞膜内に存在する膜タンパク質であり、1 分子のピロリン酸から 2 分子のリン酸を生成する加水分解反応に伴って、液胞膜の外側から液胞膜の内側に向け  $H^+$  を輸送する性質を有する。このため、 $H^+$ -ピロホスファターゼの酵素反応によって、液胞膜の内部では  $H^+$  濃度が増大し、液胞膜の外側では  $H^+$  濃度が減少する。すなわち、ピロリン酸を測定するには、ピロリン酸の測定を行いたい試料液を植物細胞等から単離してきた液胞膜に内在している状態の  $H^+$ -ピロホスファターゼに接触させ、その後、液胞膜の内側あるいは液胞膜の外側の  $H^+$  濃度変化を測定すればよい。このとき、 $H^+$ -ピロホスファターゼは必ずしも細胞から単離された液胞膜に結合した状態のままで用いられる必要はない。例えば、液胞膜より  $H^+$ -ピロホスファターゼを単離した後、人工的に形成した脂質二重層膜などの  $H^+$  をほとんど通さない膜中に  $H^+$ -ピロホスファターゼを再構築して用いてもよい。

## 【0174】

H<sup>+</sup>濃度の変化を測定する方法としては、代表的にはH<sup>+</sup>濃度の変化を光学的変化に変換して測定する方法と電氣的に測定する方法が挙げられる。H<sup>+</sup>濃度の変化を光学的変化に変換して測定する方法としては、pH試験紙、pH感受性色素、膜電位感受性色素等を用いる方法が挙げられる。電氣的に測定する方法としては、金属電極法（水素電極法、キンヒドロン電極法、アンチモン電極法がある）、ガラス電極法、ISFET電極法、パッチクランプ法、LAPS法（Light-Addressable Potentiometric Sensor）等が挙げられる。これらH<sup>+</sup>濃度の変化を測定する方法と、上記のH<sup>+</sup>-ピロホスファターゼの反応を併用することによって、試料液中のピロリン酸を光学的シグナルあるいは電氣的シグナルに変換して測定することができる。なおH<sup>+</sup>濃度変化を解析する方法としては、上記H<sup>+</sup>濃度変化解析方法に限られることはなく、他の解析方法であってもH<sup>+</sup>濃度変化を解析し得るのであればよい。

## 【0175】

そこで本実施例においては、Shizuo Yoshida等の方法（Masayoshi Maeshima and Shizuo Yoshida, (1989), J. Biol. Chem. 264 (33), p20068-20073）に準じて以下に示すようにヤエナリ由来の液胞膜からなるH<sup>+</sup>-ピロホスファターゼ液を調製した。

## 【0176】

まず、ヤエナリ由来の液胞膜小胞体をTris/Mes（濃度5mM、pH7.0）、sorbitol（濃度0.25M）、DTT（濃度2mM）からなる溶液中に溶解し、液胞膜からなる膜小胞の懸濁液とした。

## 【0177】

次に、この懸濁液を、MgSO<sub>4</sub>（濃度1mM）、KCl（濃度50mM）、sorbitol（濃度0.25M）、アクリジンオレンジ（pH感受性色素、3μM）、Hepes/Bristris propane（濃度25mM、pH7.2）からなる反応液中に混合し、H<sup>+</sup>-ピロホスファターゼ液とした。この様子を図16に模式的に示す。このとき、膜小胞にはH<sup>+</sup>-ピロホスファターゼが保持されており、膜小胞の内部および外部には一様にアクリジンオレンジが存在している。このH<sup>+</sup>-ピロホスファターゼ液を6本のチューブに均等に分注した。

## 【0178】

次に、上記実施例1と同様に、PCR反応を行なったPCR反応液1～6を上記ピロホスファターゼ液の入ったチューブにそれぞれ添加し、H<sup>+</sup>-ピロホスファターゼによる反応を開始した。

## 【0179】

本実施例においては、pH感受性色素としてアクリジンオレンジを使用している。アクリジンオレンジは液胞膜を透過可能であり、酸性条件下において蛍光を消光するという性質を有する。従って、上記H<sup>+</sup>-ピロホスファターゼ液に対してある一定量以上のピロリン酸を含む溶液を添加した場合、H<sup>+</sup>-ピロホスファターゼによるH<sup>+</sup>輸送が起こり、膜小胞内は酸性になる。このためアクリジンオレンジによる蛍光は失われる。この性質を利用して、PCR反応によって生じるピロリン酸を定量することができる。

## 【0180】

本実施例では、各PCR反応液を添加する前後のアクリジンオレンジの蛍光強度（励起光：493nm、蛍光：540nm）の変化を解析した。その結果を図17に示す。

## 【0181】

図17は、上記各PCR反応液それぞれの場合における、540nmの蛍光強度の変化を表すグラフである。ここでは、540nmの蛍光強度の変化を、上記各PCR反応液の添加後における単位秒当たりの消光率で表している。なお、図10では、PCR反応液1の場合における単位秒当たりの消光率を100%として、各PCR反応液における単位秒当たりの消光率を換算している。

## 【0182】

これよりPCR反応液1と6がほぼ同等の消光率を示すことが分かる。またPCR反応液3および4についてもほぼ同等の消光率が認められたが1や6と比較すると明らかにその消光率は小さかった。またPCR反応液2および5に関してはほとんど消光は認められなかった。

#### 【0183】

つまり、A/AゲノムDNAに関して、配列番号11に示すタイピングプライマーを用いたときだけ消光が認められ、逆にG/GゲノムDNAに関して、配列番号12に示すタイピングプライマーを用いたときだけ消光が認められた。一方、A/GゲノムDNAに関して、配列番号11および12に示すタイピングプライマーのいずれを用いた場合においても消光が認められたものの、その消光率は上記の2パターンの場合に比べて明らかに小さいものであった。

#### 【0184】

従って、本実施例において、配列番号11および12に示すタイピングプライマーを用いたPCR反応を行ない、それらについてH<sup>+</sup>-ピロホスファターゼによる反応を利用して解析することでSNP部位のタイピングをすることができた。また上記のようにA/GゲノムDNAに関して、配列番号11または12に示すタイピングプライマーを用いた場合の消光率が、A/AゲノムDNAに関して配列番号11に示すタイピングプライマーを用いた場合や、G/GゲノムDNAに関して配列番号12に示すタイピングプライマーを用いた場合に比べて明らかに小さかった理由は、A/AゲノムDNAおよびG/GゲノムDNAでは、PCR反応における鋳型となるゲノムDNAのSNP部位の塩基がAまたはGであるゲノムDNAの量が、A/GゲノムDNAの2倍であるからである。

#### 【0185】

従って、消光の有無だけではなく、消光率の定量的な解析を行うことによって、配列番号11および12のタイピングプライマーのいずれか一方のみの場合でも、SNPタイピングを行なうことができる。

#### 【0186】

##### (実施例6)

本実施例6では、実施例1と同じゲノムDNAおよびプライマーを用いてPCR反応を行った後に、そのPCR反応液中のピロリン酸をピロホスファターゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ジアホラーゼの3種類の酵素を用いて解析することで実施例1と同じ解析対象SNP部位のタイピングを行なうことを試みた。

#### 【0187】

この方法では、まず、この反応を触媒する酵素であるピロホスファターゼを用いて、ピロリン酸を加水分解して無機リン酸にする。

#### 【0188】

次に、無機リン酸は、グリセルアルデヒド3-リン酸およびニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(酸化型)とともに、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼの触媒作用を受け、1, 3-ビスホスホグリセリン酸およびNADHに変換される。

#### 【0189】

次に、生成されたニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(還元型)が、ジアホラーゼの触媒作用を受けて、電子メディエータの酸化体とともに反応し、再びニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(酸化型)に酸化する。この際、電子メディエータの酸化体は還元され、還元体となる。

#### 【0190】

最後に、生成された電子メディエータの還元体が、一定以上の電位が印加された作用極において電気化学的に酸化される。この酸化により、電子が放出され、このような電子の放出は、電流値として示され得る。このような電流の測定は、一般の電気化学的検出器を用いてなされ得る。電子メディエータとしては、フェリシアン化カリウム等を使用することができる。

#### 【0191】

電流値は、最初のピロリン酸の存在に依存するので、この酸化電流値をもとにしてピロリン酸が検出され得る。

#### 【0192】

以上を示される検出方法は、ピロリン酸の電気化学的な手法による検出を可能にする。その結果得られる電流値はまた最初のピロリン酸の量に依存するため、その検出は定量的なものである。

#### 【0193】

そこで、本実施例では、まず以下の手順で反応溶液を作製した。30 mM グリセルアルデヒド 3-リン酸 17.5  $\mu$ l (終濃度 1 mM)、10 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (酸化型) 50  $\mu$ l (終濃度 1 mM)、10 mM フェリシアン化カリウム 50  $\mu$ l (終濃度 1 mM)、100 mM 塩化マグネシウム 8  $\mu$ l (終濃度 1.6 mM)、1000 unit/ml ジアホラーゼ 5  $\mu$ l (終濃度 10 unit/ml) および 200 unit/ml ピロフォスファターゼ 1  $\mu$ l (終濃度 0.4 unit/ml)、を 50 mM Tricine-NaOH 緩衝液に溶解し、pH 8.8 に調整して総量を 400  $\mu$ l とした。さらに上記実施例 1 と同様に、PCR 反応を行なった PCR 反応液 1~6 を 50  $\mu$ l ずつ上記容器にそれぞれ添加し、反応溶液を作製した。このようにして作製した反応溶液を図 18 に示すように構成した測定装置系中に供した。本測定装置系は、次のような構成である。ガラスセル 106 を、内部に攪拌子 107 を入れて、スタラーマシン 113 上に固定した。ガラスセル 106 に、電極固定器具 108 により、測定極 109、対極 110、および参照極 111 をセットした。測定極 109 は直径 1.6 mm の金電極で、また対極 110 は白金線でそれぞれ構成した。参照極 111 は、銀/塩化銀電極で構成し、表面に塩化銀がコートされた銀線と飽和 KCl 溶液とを多孔性ガラスを介してガラスセルに接続した。これらの電極を、それぞれ電気化学測定システム (北斗電工製; 図中、114 で示される) に接続して、パソコン 115 で制御およびデータの記録を行った。上記ガラスセル 106 中に、上記の反応溶液を満たした。この反応溶液を攪拌子によって攪拌した。電気化学測定システムを用いて、参照極 111 に対して +600 mV の電位を測定極 109 に印加した。電圧印加と同時に測定を開始し、その後に 800 unit/ml グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ 20  $\mu$ l (終濃度 32 unit/ml) を加えることにより反応が開始させた。これにより、反応溶液中のメディーエータが酸化し、この酸化による電子の放出により測定極 109 と対極 110 との間に流れた電流値を電気化学測定システムを用いて測定した。60 秒後の電流値を図 19 に示す。

#### 【0194】

図 19 に示すように、PCR 反応液 1 と 6 とが、ほぼ同等の電流値を示すことが認められた。また PCR 反応液 3 および 4 についてもほぼ同等の電流値が認められたが、PCR 反応液 1 および 6 と比較すると、明らかにその電流値は小さかった。また、PCR 反応液 2 および 5 に関してはさらに電流値は低かった。

#### 【0195】

つまり、A/G ゲノム DNA に関して、配列番号 11 のタイピングプライマーを用いたときだけ酸化電流が認められ、逆に G/G ゲノム DNA に関して、配列番号 12 のタイピングプライマーを用いたときだけ酸化電流が認められた。一方、A/G ゲノム DNA に関して、配列番号 11 および 12 のタイピングプライマーのいずれを用いた場合においても電流が認められたものの、その電流値は上記の二パターンの場合に比べ明らかに小さいものであった。

#### 【0196】

従って、本実施例において、上記タイピングプライマーを用いて PCR 反応およびその PCR 反応液中のピロリン酸をピロホスファターゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ジアホラーゼの 3 種類の酵素を用いて解析することで解析対象 SNP 部位のタイピングをすることができた。

#### 【0197】

また、上記のように A/G ゲノム DNA に関して、配列番号 11 および 12 のタイピン

グプライマーを用いた場合の電流値が、A/AゲノムDNAに関して配列番号11のタイピングプライマーを用いた場合や、G/GゲノムDNAに関して配列番号12のタイピングプライマーを用いた場合に比べて明らかに小さかった理由は、A/AゲノムDNAおよびG/GゲノムDNAでは、PCR反応における鋳型となるSNP部位の塩基がAまたはGであるゲノムDNAの量が、A/GゲノムDNAの2倍であるからである。

#### 【0198】

従って、電流値の定量的な解析を行なうことによって、配列番号11および12のタイピングプライマーのいずれかを一方のみを用いた場合でも、SNPタイピングが可能であることが確認できた。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0199】

本発明にかかる塩基種判別方法によれば、核酸中の所望の塩基の種類を正確かつ再現性良く判別することができ、医療機器や薬剤分野において有用である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0200】

【図1】図1は、従来のSNPタイピング技術を説明する工程図

【図2】図2は、従来のSNPタイピング技術を説明する工程図

【図3】図3は、従来のSNPタイピング技術において得られたDNA断片を電気泳動によって解析した図

【図4】図4(a)および図4(b)は、従来のタイピングプライマーの構造を表す図

【図5】図5(a)～図5(d)は、プライマー伸長反応が確実に進行しない条件を調査する方法を説明する工程図

【図6】図6は、プライマー伸長反応が確実に進行しない条件の調査において得られたDNA断片を電気泳動によって解析した図

【図7】図7(a)～図7(c)は、実施形態1の塩基種判別方法において用いられるタイピングプライマーを模式的に示す図

【図8】図8(a)～図8(d)は、実施形態1の一本鎖の標的核酸が有する置換領域の塩基配列の塩基種を判別する方法の各工程を表す図

【図9】図9(a)～図9(d)は、実施形態1の一本鎖の標的核酸が有する置換領域の塩基配列の塩基種を判別する方法の各工程を表す図

【図10】図10(a)～図10(c)は、実施形態2のSNPタイピングに用いるタイピングプライマーの構成を表す模式図

【図11】図11は、PCR反応の条件を示す図

【図12】図12は、PCR反応後の各PCR反応液中に含まれているピロリン酸量と、発光強度との関係を表す図

【図13】図13は、プライマー伸長反応の条件を示す図

【図14】図14は、プライマー伸長反応後の各プライマー伸長反応液中に含まれているピロリン酸量と発光強度との関係を表す図

【図15】図15は、 $H^+$ -ピロホスファターゼを模式的に表す図

【図16】図16は、 $H^+$ -ピロホスファターゼ液の様子を模式的に示す図

【図17】図17は、PCR反応後における各PCR反応液それぞれの540nmの蛍光強度の変化を表すグラフ

【図18】図18は、電流値を測定するための例示の測定装置系を示す模式図

【図19】図19は、PCR反応後の各PCR反応液中に含まれているピロリン酸量と、電流値との関係を表す図

#### 【符号の説明】

#### 【0201】

1, 2 DNA

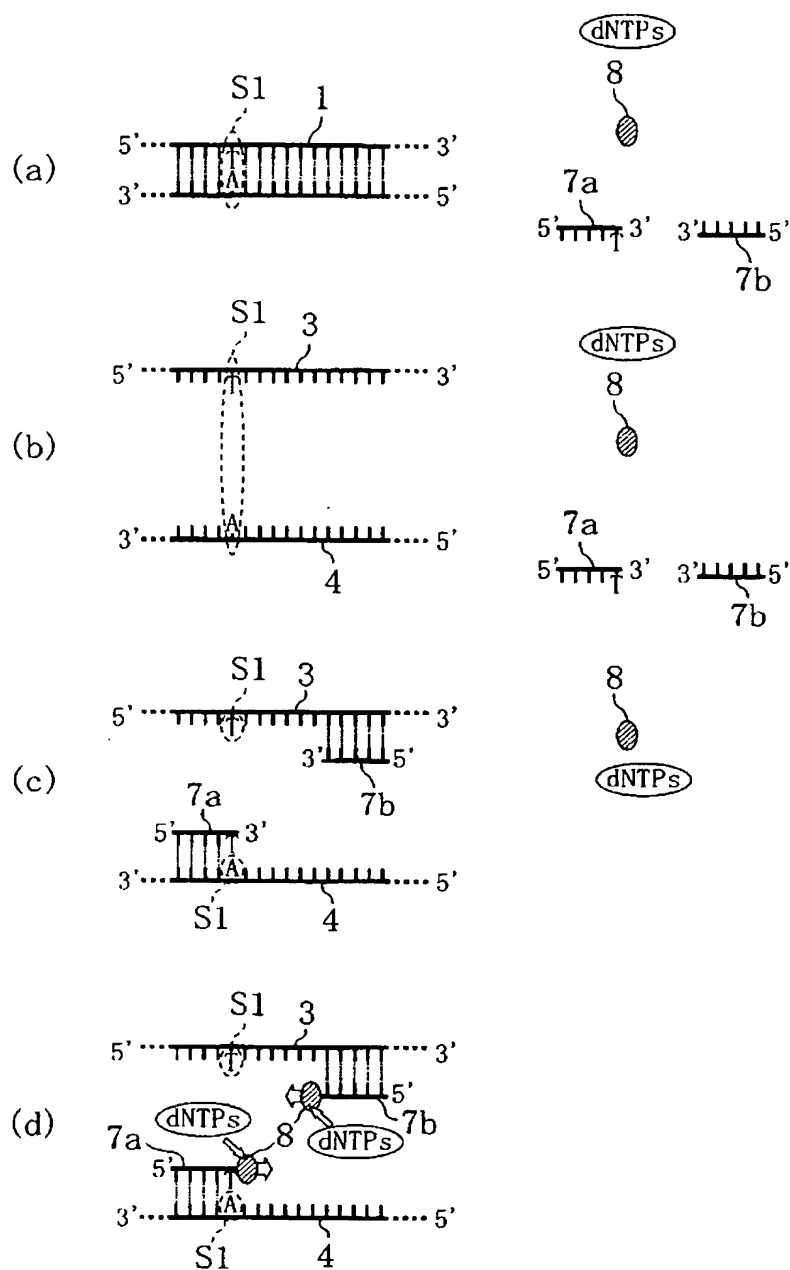
3, 4, 5, 6, 54, 56 一本鎖DNA

7 a タイピングプライマー  
7 b リバースプライマー  
8, 18, 28 DNAポリメラーゼ  
10, 10' タイピングプライマー  
11 DNA  
13, 14 一本鎖DNA  
17 a フォワードプライマー  
17 b リバースプライマー  
20 リバースプライマー  
30 核酸ポリメラーゼ  
34 a, 34 b, 44 a, 44 b 一本鎖の核酸  
35 a, 35 b, 45 a, 45 b 置換領域  
36, 38 二本鎖の核酸  
106 ガラスセル  
107 攪拌子  
108 電極固定器具  
109 測定極  
110 対極  
111 参照極  
112 反応溶液  
113 スターマシン  
114 電気化学測定システム  
115 パソコン

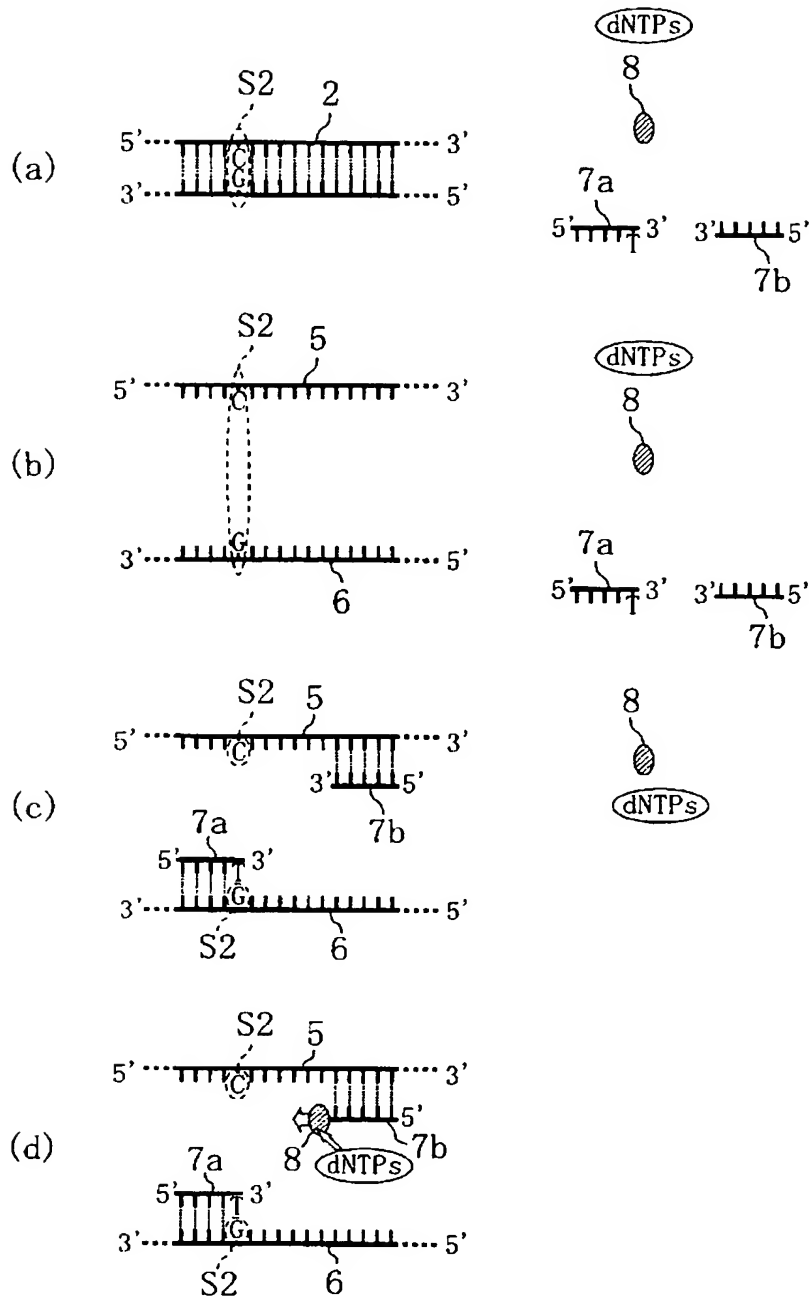


【書類名】 図面

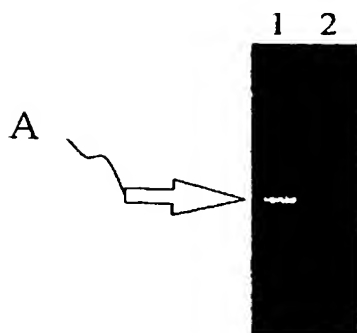
【図 1】



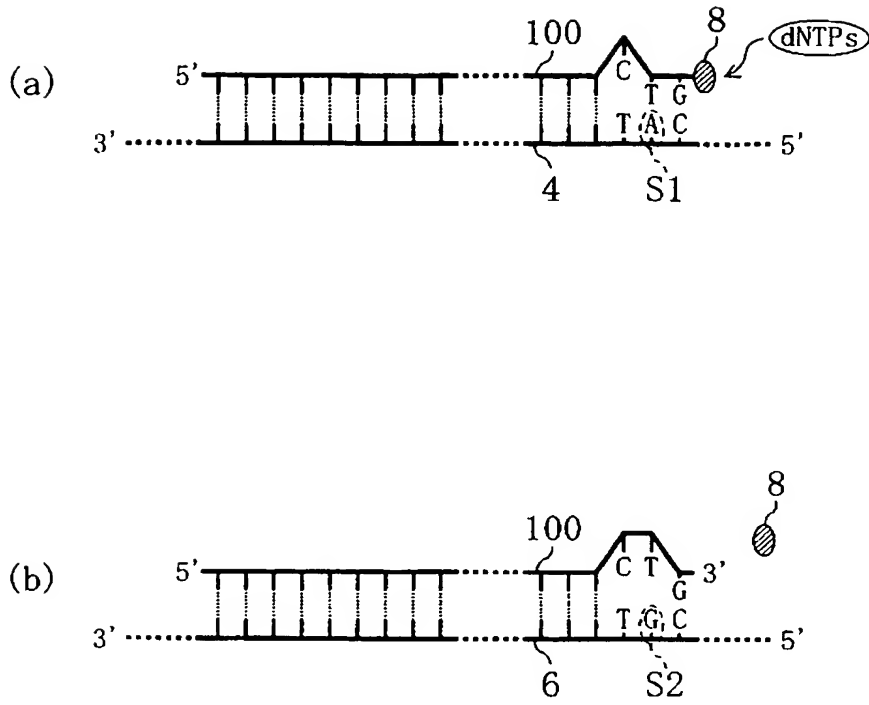
【図 2】



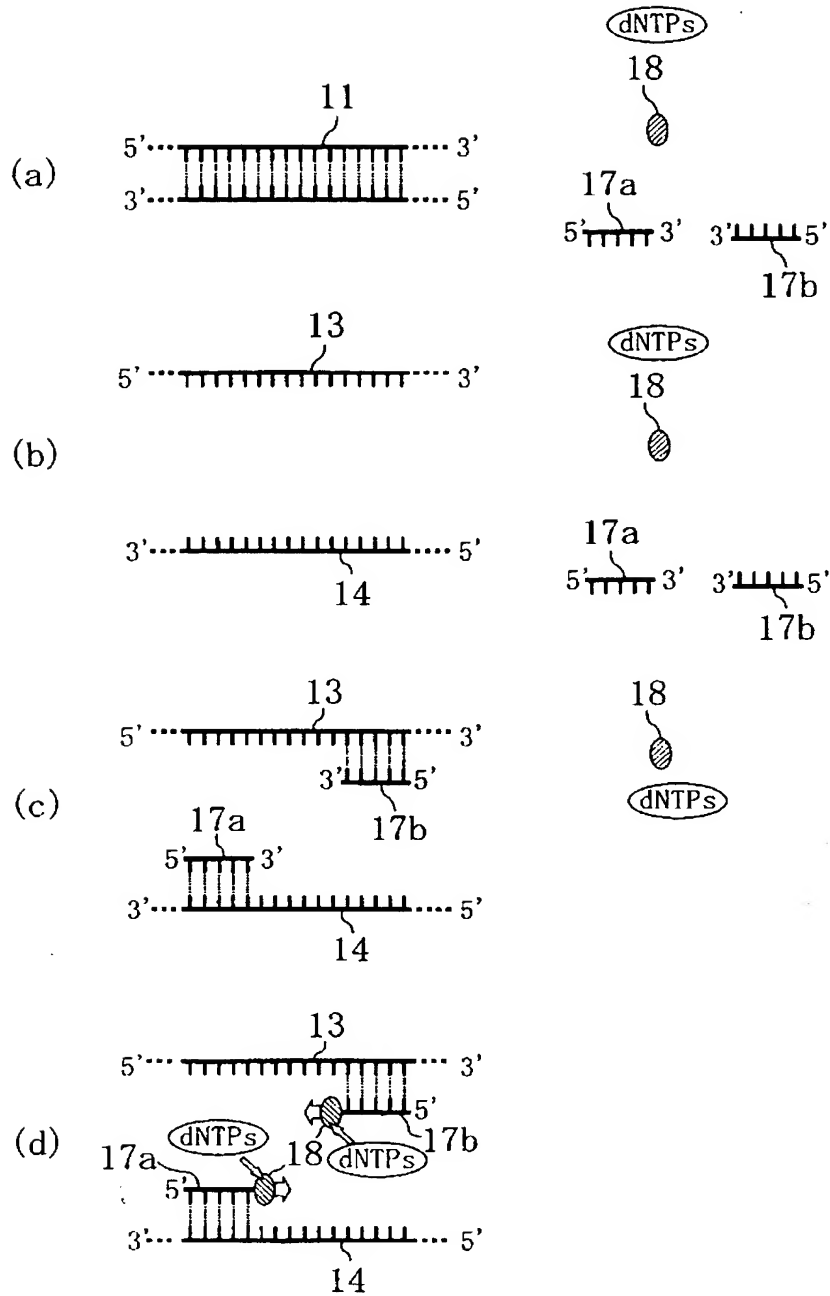
【図 3】



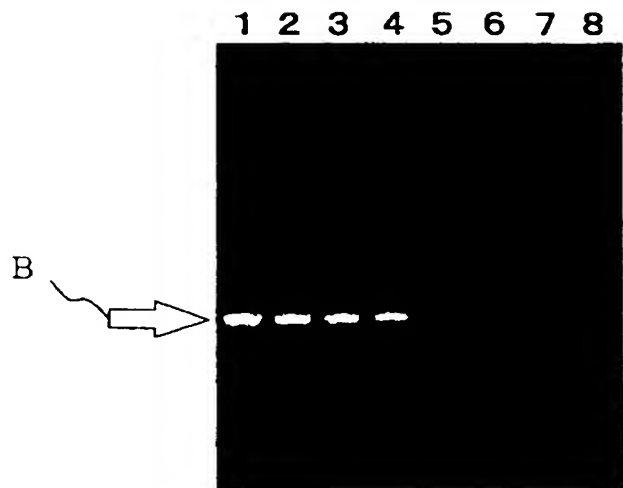
【図 4】



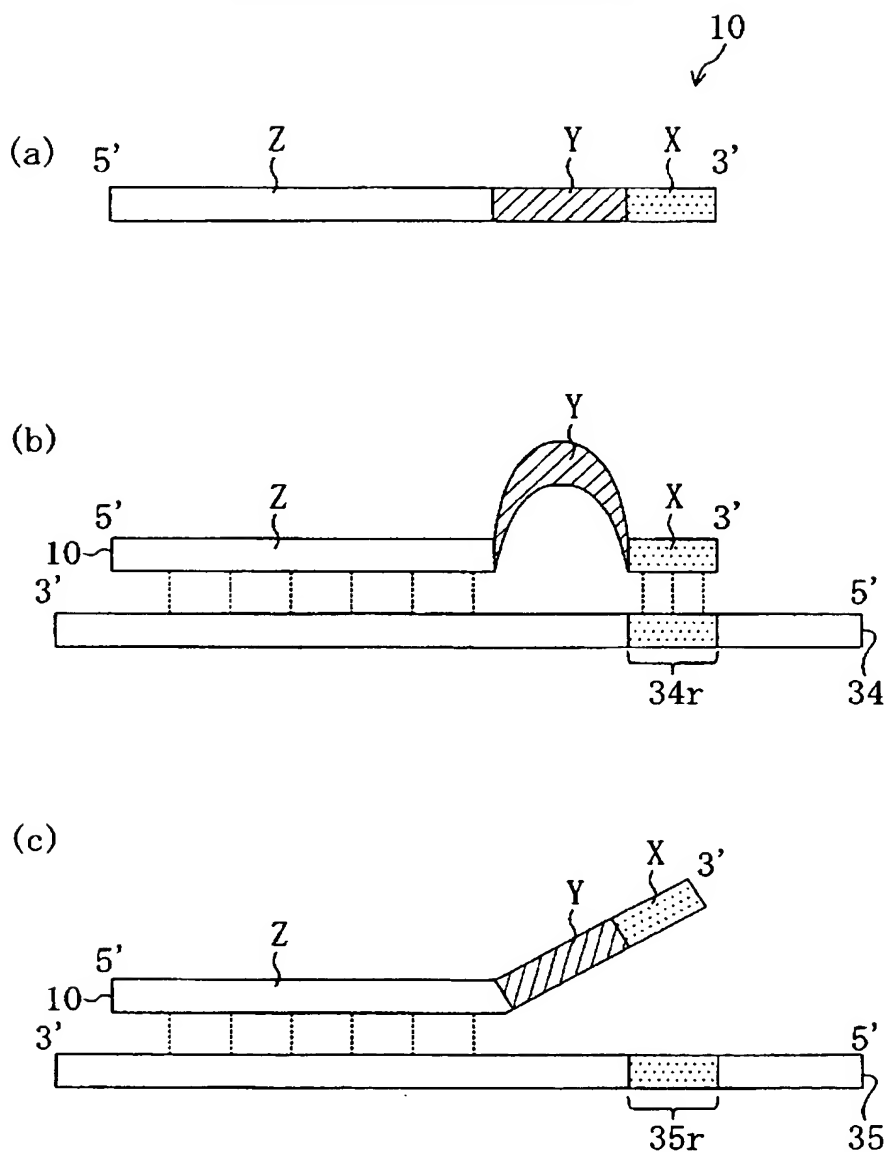
【図 5】



【図 6】



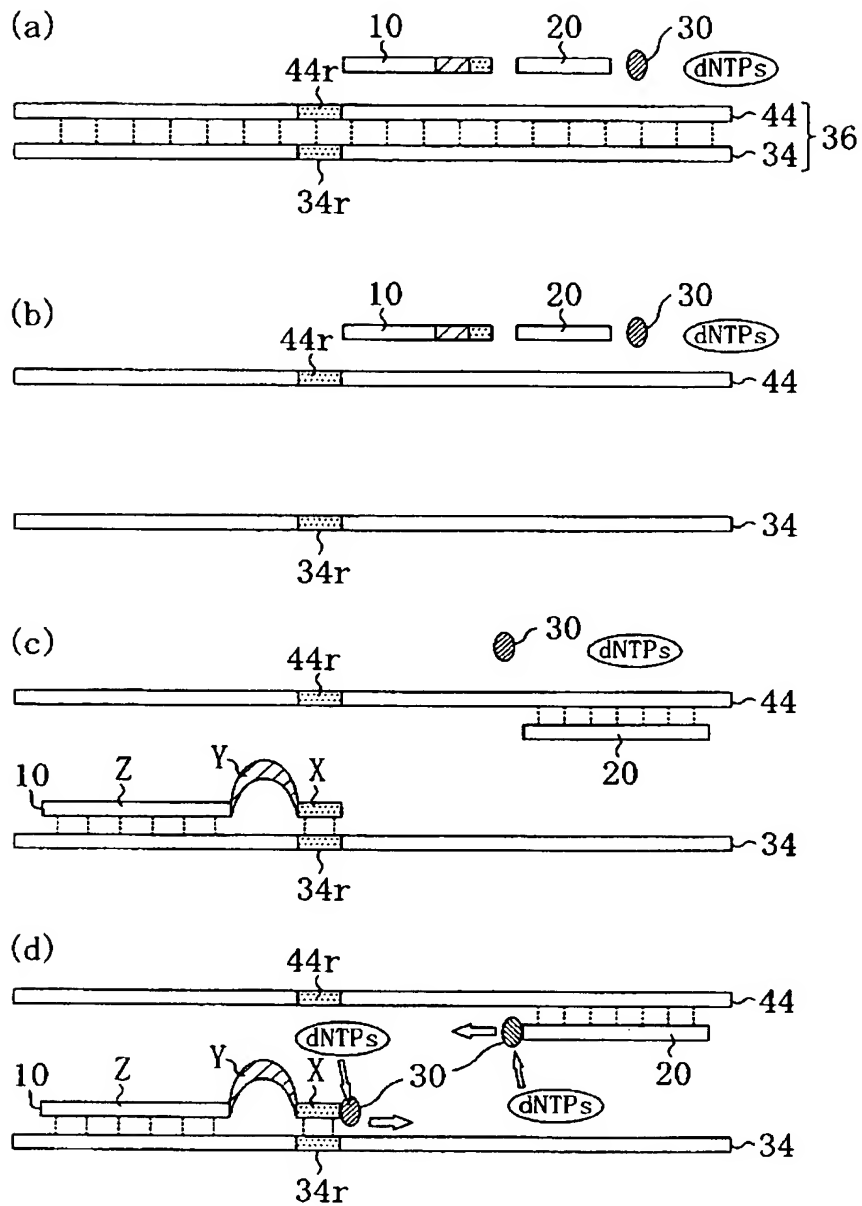
【図 7】



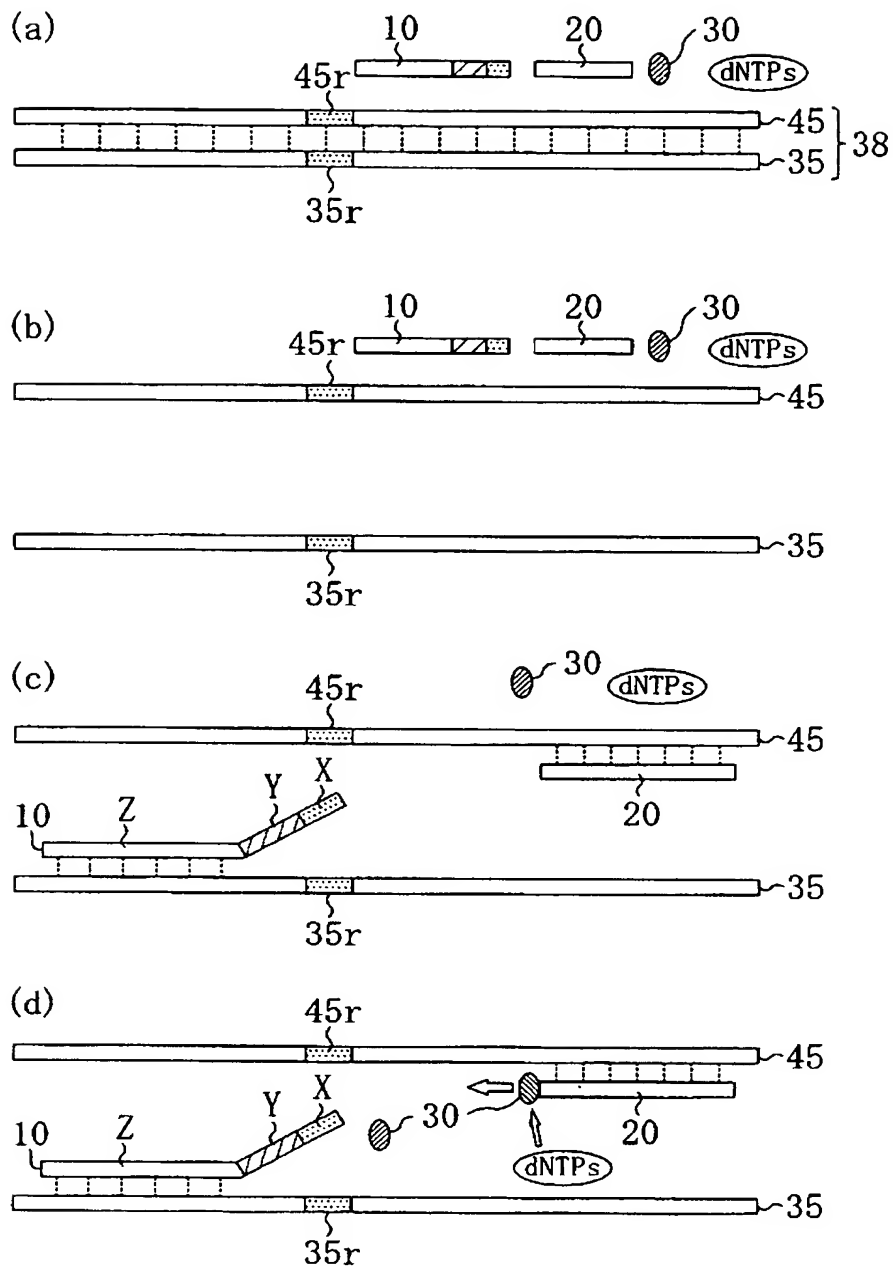
BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

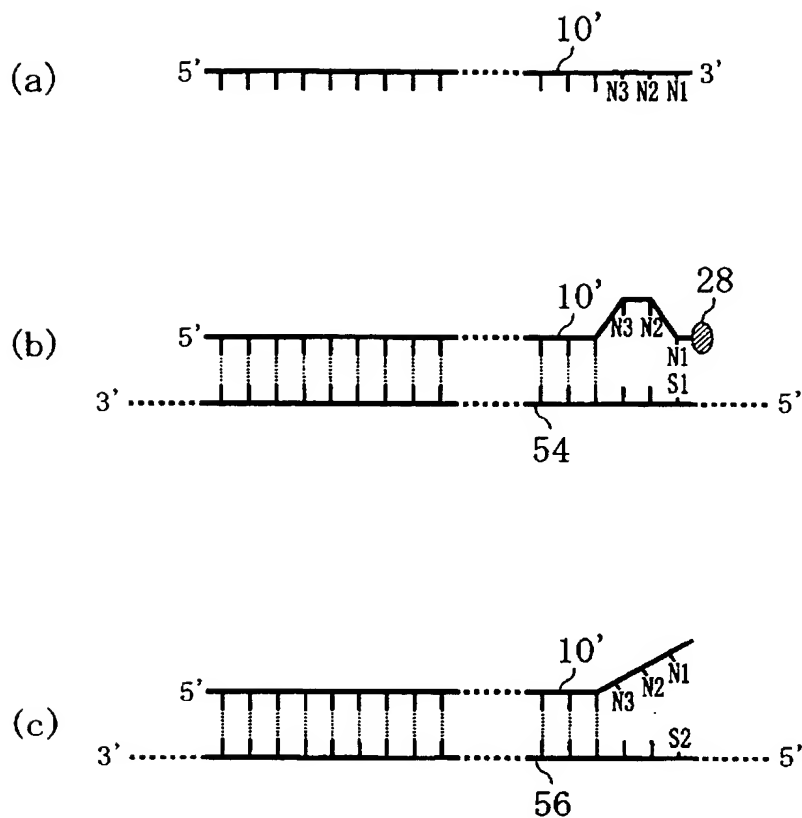
【図 8】



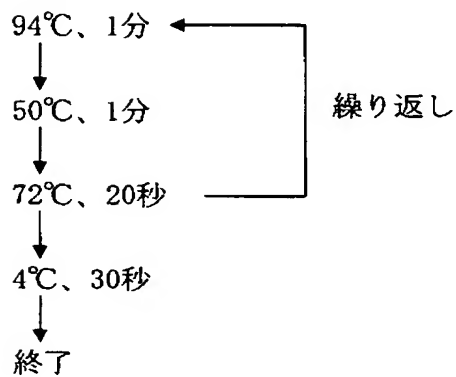
【図 9】



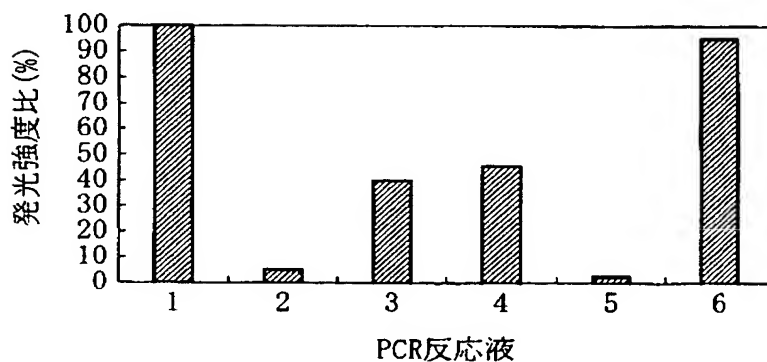
【図 10】



【図 11】

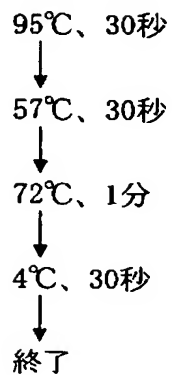


【図 12】

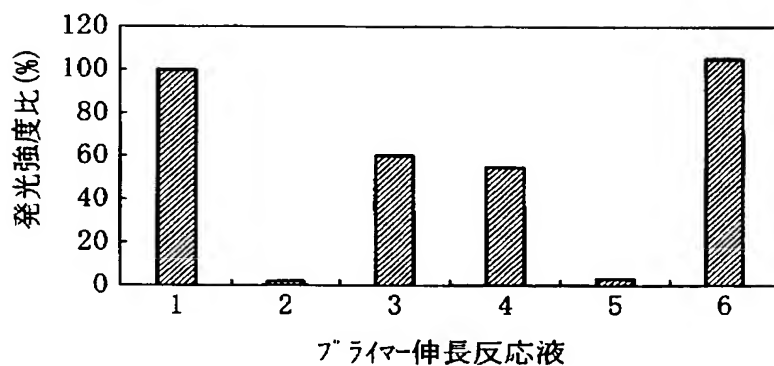




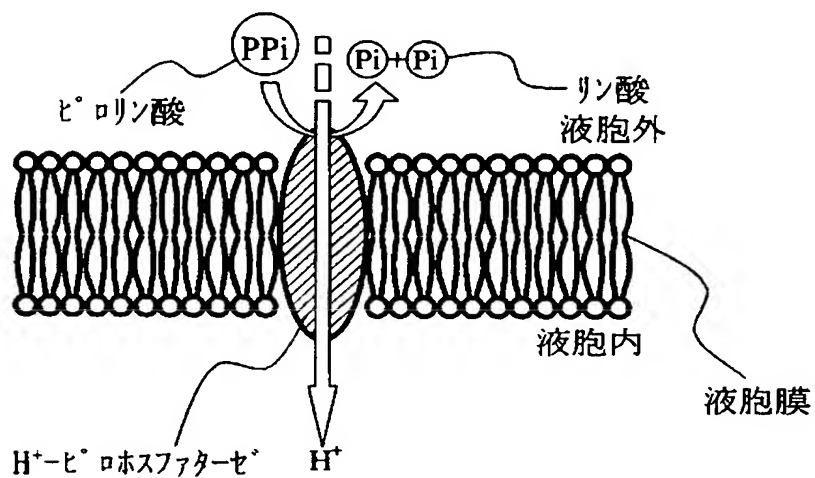
【図 1 3】



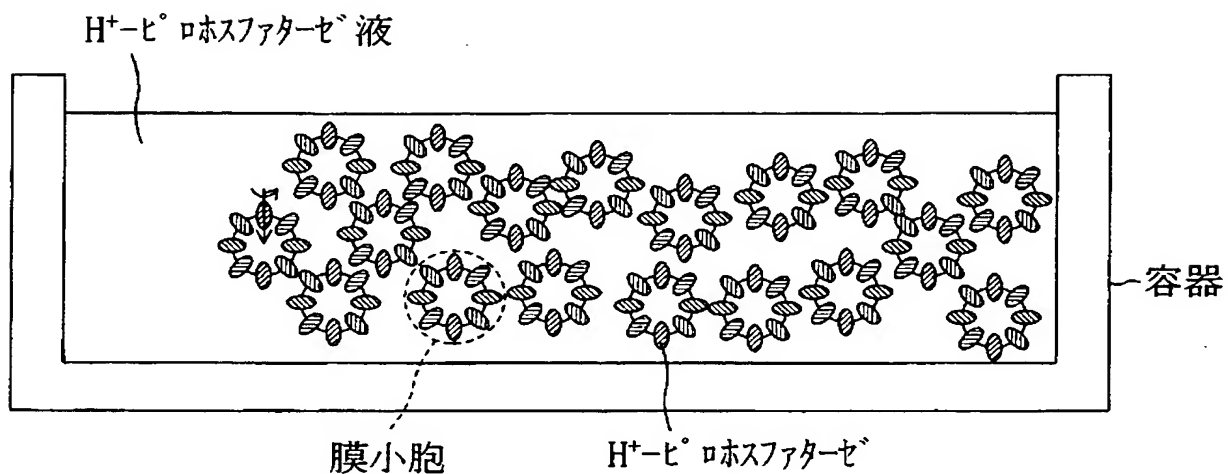
【図 1 4】



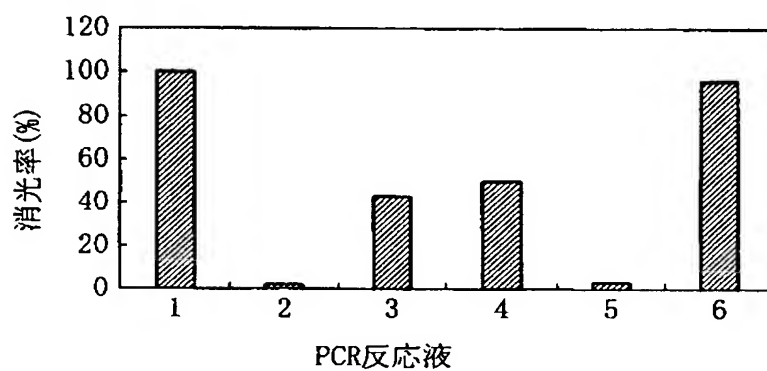
【図 1 5】



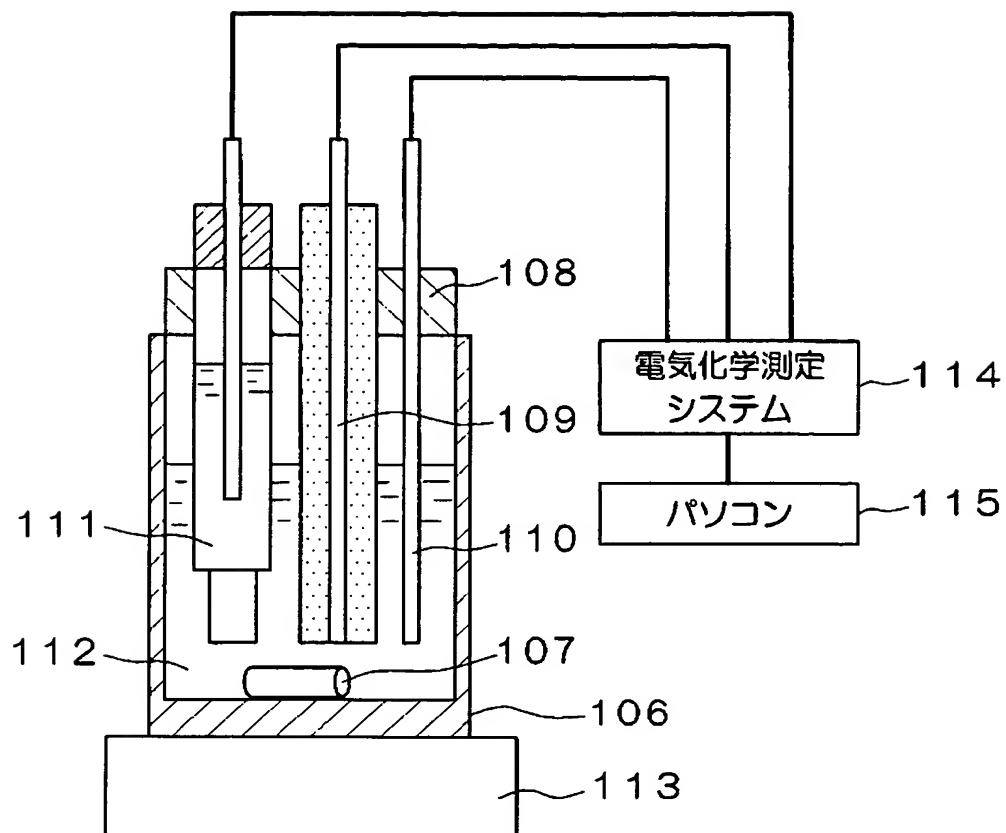
【図16】



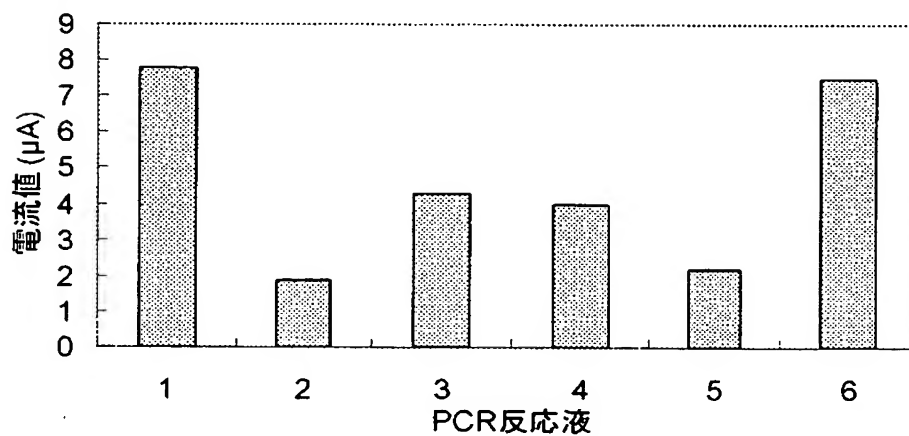
【図17】



【図 18】



【図 19】



**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** 核酸中の所望の塩基の種類を正確に且つ再現性よく判別するための塩基種判別方法およびそれに用いるプライマーを提供する。

**【解決手段】** タイピングプライマー 10 は、塩基種が置換されている可能性のある置換領域を含む一本鎖の標的核酸に部分的にハイブリダイズ可能な一本鎖の核酸からなる。タイピングプライマー 10 を構成する一本鎖の核酸は、図 7 (a) に示すように、置換対応領域 X と、非相補領域 Y と、相補領域 Z とを備えている。置換対応領域 X は、一本鎖の核酸の 3' 末端塩基を含み、一本鎖の標的核酸の置換領域の塩基種に応じて、一本鎖の標的核酸に対して相補的または非相補的のいずれかとなり得る塩基配列を有する。非相補領域 Y は、置換対応領域 X の 5' 側に隣接し、一本鎖の標的核酸に対して非相補的な塩基配列を有する。相補領域 Z は、非相補領域 Y の 5' 側に隣接し、一本鎖の標的核酸に対して相補的な塩基配列を有する。

**【選択図】** 図 7

特願 2 0 0 3 - 2 8 8 7 0 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 5 8 2 1 ]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地

氏 名

松下電器産業株式会社